

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CARACTÉRISATION DES PROPRIÉTÉS ANGIOGÉNIQUES DES CELLULES
STROMALES HUMAINES DE LA MOELLE OSSEUSE ET LEUR POTENTIEL
THÉRAPEUTIQUE

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
LAURENCE LEJEUNE

JANVIER 2015

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

SERVICE DES BIBLIOTHÈQUES

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire "*Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs*" (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

REMERCIEMENTS

Ce mémoire de maîtrise a pris son temps pour voir le jour. Ce projet a pu être mené à bien grâce à l'aide précieuse, tout d'abord de l'UQAM qui avec son programme d'étude à temps partiel m'a permis de continuer en parallèle une vie professionnelle intense et mes études en offrant des cours du soir et de la flexibilité dans l'exécution des expériences et surtout dans la rédaction du mémoire.

Grâce à la collaboration de mon directeur de maîtrise, Dr Borhane Annabi et mon directeur de laboratoire Dr Jacques Galipeau, j'ai pu profiter des ressources extraordinaires de ces deux environnements de travail de grande qualité. Merci pour votre patience et votre soutien constants.

Merci à Moira François pour son aide précieuse dans le suivi en commun des lignées de cellules, mais aussi d'avoir pu apporter son expertise pour le travail avec les animaux.

Merci au Dr Khadidja Haidara pour son soutien et ses conseils éclairés lors de la rédaction de ce mémoire. Grâce à sa rigueur et à sa vision globale du projet, j'ai pu voir la lumière au bout du tunnel et envisager ce projet comme une belle histoire à raconter

Un petit clin d'œil aussi à la Dre Claire Brown qui a su optimiser l'information de mes images de microscopie pour en faire des données interprétables et quantifiables.

Enfin, je souhaitais remercier mon conjoint Christian pour son enthousiasme constant et qui est à l'origine de ce projet. Eh oui j'ai été capable ! Et aussi mes deux petits amours qui sont nés dans l'intervalle et qui auront été témoins d'une gestation beaucoup plus longue que la leur pour enfin « accoucher » de ce mémoire qui était un membre omniprésent de la famille toutes ces années.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	vi
LISTE DES TABLEAUX.....	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	viii
RÉSUMÉ.....	x
CHAPITRE I	
INTRODUCTION.....	1
1.1. Introduction générale.....	1
1.2. Les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes de la moelle osseuse	2
1.2.1. Définitions	3
1.2.2. Caractéristiques physiologiques	5
1.2.2.1. Plasticité et potentiel de cellules souches	8
1.2.2.2. Potentiel migratoire et recrutement	10
1.2.3. Implication dans d'autres mécanismes physiologiques ou pathologiques	11
1.2.3.1. Rôle immunologique	11
1.2.3.2. Rôle dans le développement tumoral.....	12
1.2.3.3. Maladies liées au dysfonctionnement des CSMh : Le cas de la maladie de Gaucher.....	15
1.2.4. Potentiel thérapeutique des CSMh.....	16
1.2.4.1. Exemples d'approches en thérapie cellulaire	19
1.2.4.2. Approches de thérapie génique.....	21
1.2.4.3. Exemples d'approches immunologiques	22
1.2.4.4. Approches anticancéreuses.....	23
1.2.4.5. Approches pro-angiogéniques	23
1.3. L'angiogenèse	24
1.3.1. Angiogenèse physiologique.....	25
1.3.2. Angiogenèse pathologique.....	26
1.3.2.1. Angiogenèse tumorale	28

1.3.2.2. Le modelage de la matrice extracellulaire lors de l'angiogenèse	30
1.3.2.3. Le rôle de MT1-MMP	31
1.3.2.4. Le CD44.....	32
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE.....	34
CHAPITRE III	
MATERIEL ET MÉTHODES	35
3.1. Isolation, culture et caractérisation des cellules	35
3.1.1. Isolation et culture des CSMh.....	35
3.1.2. Différenciation en ostéoblastes et adipocytes.....	36
3.1.3. Phénotypage par cytométrie de flux	37
3.1.4. Tests d'adhésion	37
3.1.5. Tests de migration et quantification par analyse d'image	38
3.2. Évaluation du potentiel pro-angiogénique des CSMh <i>in vivo</i>	39
3.2.1. Évaluation de la spécificité des anticorps dans un modèle de xénogreffe tests d'immunoréactivité croisée	39
3.2.2. Injection et isolation des implants de Matrigel.....	39
3.2.3. Caractérisation par cytométrie de flux et histologie	40
3.3. Potentiel angiogénique <i>in vitro</i> des CSMh.....	40
3.3.1. Étude des formations de structure sur Matrigel.....	40
3.3.2. Expression de MT1-MMP par RT-PCR.....	41
CHAPITRE IV	
RÉSULTATS	42
4.1. Les CSMh présentent les caractéristiques de cellules stromales humaines de la moelle osseuse.....	42
4.2. Les propriétés d'adhésion et de migration des CSMh sont compatibles avec leurs propriétés pro-angiogéniques	44
4.3. Les CSMh montrent leur potentiel pro-angiogénique <i>in vivo</i> sans se différencier en cellules endothéliales.....	48
4.4. Les CSMh montrent leur potentiel pro-angiogénique <i>in vitro</i> en normoxie de manière MT1-MMP-indépendante.....	51

CHAPITRE V	
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	55
CONCLUSION	59
BIBLIOGRAPHIE	60

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Populations cellulaires de la moelle osseuse.....	6
1.2 Différenciation des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes et des cellules souches hématopoïétiques.....	8
1.3 Plasticité potentielle chez les cellules souches non humaines.....	9
1.4 Propriétés immunologiques des cellules stromales de la moelle osseuse.....	12
1.5 Néo vascularisation tumorale induite par les cellules stromales murines in vivo	13
1.6 Effets paracrins des cellules stromales de la moelle osseuse mises en culture...	20
1.7 Angiogenèse physiologique.....	26
1.8 Angiogenèse tumorale.....	29
1.9 Structure chimique de l'acide hyaluronique.....	33
4.1 Caractérisation des CSMh.....	43
4.2 Phénotype des CSMh	44
4.3 Propriétés d'adhésion des CSMh	45
4.4 Facteurs de modulation de la migration des CSMh	47
4.5 Néo-vascularisation d'un implant de Matrigel	49
4.6 Composition cellulaire des implants vascularisés.....	50
4.7 Cinétique de la formation de structure sur Matrigel des CSMh.....	52
4.8 Expression du MT1-MMP chez les CSMh	54

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Marqueurs de surface différentiels pour la caractérisation des CSM.....	4
1.2 Traitement de maladies par les cellules stromales mésenchymateuses dans des modèles animaux.....	17
1.3 Exemples d'essais cliniques utilisant des traitements à base de CSM publiés sur clinicaltrials.gov.....	18
1.4 Exemples de maladies dépendantes de l'angiogenèse.....	27

LISTE DES ABRÉVIATIONS

3D	3 Dimensions
ABI	Index cheville brachiale
ADN	Acide désoxyribonucléique
AH	Acide hyaluronique
α MEM	Milieu minimal d'Eagle α
APC	Allophycocyanine
ARN	Acide ribonucléique
BMP-2	Protéine morphogénique de l'os
CD	« <i>Cluster of Differentiation</i> »
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CO ₂	Dioxyde de carbone
CPA	Cellules présentatrices d'antigène
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
CSMh	Cellules stromales mésenchymateuses humaines
CSMm	Cellules stromales mésenchymateuses murines
DMEM	« <i>Dulbecco's Minimum Eagle Medium</i> »
DMSO	DiMethyl SulfOxyde
dNTP	Nucléotides
DO	Densité optique
EDTA	Éthylène Diamine Tétra acétique
ESC	Cellules souches embryonnaires
FAC	Fibroblastes associés aux carcinomes
FBS	Sérum de veau foetal
GBA	Beta Glucocerebrosidase
G-CSF	« <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> »
HGF	« <i>Hepatocyte Growth Factor</i> »
HLA	Human Leukocyte Antigen
IDO	Indoleamine 2,3 dioxygenase
IFN γ	Interféron gamma

IL	Interleukine
IL1RN	Antagoniste du récepteur de l'IL-1
M-CSF	« <i>Macrophage-colony stimulating factor</i> »
MEC	Matrice extracellulaire
MELD	Maladie du foie en phase terminale
MMP	Métalloprotéines de la matrice
MO	Moelle osseuse
OCT	Produit de congélation : « <i>Optimum Cutting Temperature</i> »
OI	Osteogenesis imperfecta
Pb	Paires de base
PBS	« <i>Phosphate Buffer Saline</i> »
PDGF	« <i>Platelet Derived Growth Factor</i> »
PE	Phycoérythrine
PGE2	Prostaglandine E2
PT	Temps de prothrombine
S1P	Sphingosine 1 phosphate
TBIL	Bilirubine totale
TGF	« <i>transforming growth factor</i> »
Th1	Cellules T auxiliaires de type 1
Th17	Cellules T auxiliaires de type 17
Th2	Cellules T auxiliaires de type 2
TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha
Treg	Cellules T de régulation
TSG-6	« <i>tumor necrosis factor inducible gene protein-6</i> »
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

RÉSUMÉ

Les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse constituent un champ de recherche très actif. L'approche qui consiste à les utiliser comme outil thérapeutique cellulaire date seulement du début des années 2000, mais les premiers modèles développés étaient essentiellement murins. L'étude présentée ici vise à confirmer dans les cellules stromales de la moelle osseuse humaines (CSMh) leur potentiel pro-angiogénique, mais aussi à identifier certains facteurs pouvant expliquer ces propriétés. Après l'isolation, l'identification phénotypique et l'évaluation de leur potentiel de différenciation *in vitro* des CSMh, nous avons déterminé certaines propriétés d'adhésion et de migration *in vitro* compatibles avec leur profil pro angiogénique et pluripotent. Nous avons ensuite démontré la capacité pro-angiogénique des CSMh *in vivo* dans un modèle tridimensionnel de matrice et évalué, quantifié l'infiltrat cellulaire de l'implant afin de déterminer la proportion de cellules murines contribuant à la vascularisation du Matrigel, constitué en partie de cellules endothéliales, mais aussi de cellules hématopoïétiques. De plus, nous avons identifié les CSMh toujours présentes dans le Matrigel après deux semaines et avons identifié deux sous-populations exprimant différents niveaux de CD44, l'une d'entre elles indiquant la probable différenciation des CSMh en péricytes. Nous avons enfin tenté d'élucider le rôle potentiel du CD44 dans un modèle bidimensionnel *in vitro*, qui est surexprimé pendant la formation de structure. Toutefois, nous avons pu déterminer que le mécanisme est MT1-MMP indépendant en étudiant la variation de ses niveaux d'expression sur Matrigel, sous l'action d'inhibiteurs de métalloprotéases.

Mots clés : Cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse, pluripotente, angiogenèse, Matrigel, CD44, MT1-MMP, péricytes, thérapie cellulaire

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Introduction générale

Certains des objectifs fondamentaux de la recherche médicale moderne sont de comprendre les mécanismes qui mènent à la maladie, d'identifier des cibles thérapeutiques et de développer des « médicaments » permettant d'obtenir un effet durable ou transitoire sur la pathologie ou la condition ciblée. Un des développements notables dans ce type d'approche est d'utiliser les propriétés physiologiques intrinsèques de l'organisme pour répondre à la menace. Il peut s'agir d'utiliser des organes ou des cellules d'un donneur (greffe d'organe ou de moelle osseuse, transfusion sanguine), mais aussi parfois des cellules appartenant au patient lui-même (Reconstitution hématopoïétique après irradiation, greffe de peau autologue, etc. ...) (Gratwohl *et al*, 2013).

Que ce soit dans le cadre d'une approche autologue ou hétérologue, de nouvelles sources cellulaires de support thérapeutiques sont décrites régulièrement dans la littérature. L'un des types cellulaires le plus étudié ces dernières années est celui des cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse (CSM). Leurs premières apparitions dans la littérature scientifique les décrivaient comme support essentiel à la culture des cellules souches hématopoïétiques (Till & McCulloch, 1961). Dans un premier temps, leur intérêt semblait réduit à cette seule application, toutefois, à la suite de l'identification de certaines de leurs propriétés très particulières, leur étude s'est grandement intensifiée. Elles représentent maintenant à elles seules un vaste champ d'études et leur domaine d'utilisation potentielle, que ce soit pour des applications thérapeutiques ou encore comme modèle de recherche fondamentale, ne cesse de s'étendre. À ce jour, l'utilisation du moteur de recherche bibliographique Pubmed avec les termes cellules stromales de la moelle osseuse renvoie 28769 entrées (en date du 17 avril 2014).

Au-delà de leur intérêt thérapeutique largement étudié, il est fondamental de comprendre leur mode de fonctionnement dans un contexte physiologique, pathologique ou thérapeutique.

Parmi les principales caractéristiques des CSMh, on compte leur remarquable capacité pro-angiogénique (Aghi & Chiocca, 2005). Elles ont un potentiel migratoire et /ou chémoatractant qui selon le contexte leur permettent de migrer vers une cible inflammatoire (Ries *et al*, 2007) ou encore d'envoyer des signaux afin d'attirer des cellules de support (Annabi *et al*, 2003a). Elles peuvent remodeler leur environnement grâce à leurs interactions avec la matrice via les métalloprotéases (MMP) (Steingen *et al*, 2008). Elles ont la capacité de se différencier (Lu *et al*, 2010) et ont des fonctions paracrines (Khubutiya *et al*, 2014; Kinnaird *et al*, 2004). Toutes ces fonctions sont possibles grâce à des mécanismes complexes qui restent à être complètement élucidés et étudiés.

1.2. Les cellules stromales mésenchymateuses multipotentes de la moelle osseuse

Lorsque l'équipe de McCulloch et Till découvrit en 1961 le potentiel thérapeutique énorme des cellules souches hématopoïétiques (CSH) issues de la moelle osseuse, un nouveau domaine d'étude prenait alors son essor. Une greffe de ces cellules souches adultes avait permis de reconstituer l'hématopoïèse de souris irradiées. La notion de cellule souche était connue depuis quelques années et s'était développée initialement dans le cadre de la biologie végétale, de plus la notion de cellule souche embryonnaire était déjà bien documentée chez l'animal. C'était toutefois la première fois que l'on pouvait appliquer cette notion à des cellules animales adultes et, fait encore plus intéressant, ces cellules souches présentaient des propriétés thérapeutiques indéniables. En parallèle de ces découvertes, l'équipe de E. Donnall Thomas (Ferrebee & Thomas, 1958) étudiait déjà, dès la fin des années 50, la greffe de moelle osseuse (MO) sur des patients leucémiques autrement condamnés. Lorsqu'au début des années 70, après avoir affronté de nombreux problèmes de compatibilité donneur-receveur, son équipe put enfin traiter une patiente de 16 ans, les espoirs placés dans l'utilisation des cellules souches adultes se concrétisèrent enfin. (Buckner *et al*, 1970).

Bien sûr, parallèlement à ces avancées médicales majeures, de nombreux chercheurs étudièrent la biologie de ces cellules souches hématopoïétiques. Pour ce faire, il était nécessaire de les mettre en culture au moins pendant un certain temps, voire d'établir des lignées cellulaires stables (Coulombel *et al*, 1983). Il était alors essentiel de fournir aux

cellules les nutriments et autres compléments nécessaires à leur survie et à leur croissance (Lord & Wright, 1980). Les chercheurs ont alors eu l'idée de reconstituer dans leur boîte de culture le microenvironnement dans lequel ces cellules évoluaient *in vivo*. En isolant la moelle totale, ils purent mettre en culture et identifier une population de cellules adhérentes de type fibroblastique (Clark & Keating, 1995). En présence de ces cellules, les CSH purifiées (Worton *et al*, 1969), non adhérentes, purent s'adapter aux conditions de culture cellulaire *in vitro* et ainsi être étudiées avec plus d'efficacité. Avec les années, le champ thérapeutique des cellules souches hématopoïétiques s'est non seulement étendu, mais affiné. Toutefois, la moelle osseuse n'avait pas fini de nous révéler ses mystères. En 1961, l'équipe de Friedenstein identifia d'autres cellules de la moelle osseuse possédant des propriétés de différenciation et d'autorenouveauement (Friedenstein, 1961). Ces cellules résidentes du compartiment stromal de la moelle osseuse furent nommées cellules souches mésenchymateuses du fait de leur capacité à se différencier dans la lignée mésenchymateuse. Il fallut attendre 1970 pour que la même équipe les isole dans un modèle de cobaye.(Friedenstein *et al*, 1970).

C'est seulement au début des années 90 que ces cellules sont isolées chez l'homme par Caplan et son équipe (Caplan, 1991) et enfin en 1999 dans son article publié dans Science (Pittenger, 1999) Pittenger les caractérise de manière exhaustive. Bien qu'étudiées par de nombreux laboratoires à travers le monde, une controverse avait existé jusque-là sur la façon de caractériser et définir précisément les cellules stromales de la moelle osseuse.

1.2.1. Définitions

De nombreux chercheurs ont depuis isolé et étudié ces cellules et leur nombre ne cesse de grandir. Toutefois, il est apparu nécessaire d'établir des critères clairs de définition. En effet d'un laboratoire à l'autre, les méthodes d'isolation et de culture des cellules étaient parfois très différentes rendant les comparaisons et interprétations des résultats assez hasardeux. Réunis sous l'égide de la Société Internationale de Thérapie Cellulaire (ISCT), les chefs de file dans l'étude de CSMh établirent en 2006 les critères minimaux permettant de définir clairement ces cellules (Dominici *et al*, 2006). En résumé, ces critères sont les suivants

(Tableau 1.1). Tout d'abord les cellules isolées doivent adhérer au plastique, elles doivent ensuite exprimer le CD105 (connu aussi sous le nom d'endogline, reconnu à l'origine par l'anticorps monoclonal SH2), le CD73 (ecto 5' nucleotidase, reconnu à l'origine par les anticorps monoclonaux SH3 et SH4), CD90 (Thy-1) et ce à plus de 95% et doivent être négatives (moins de 2%) pour l'expression de CD45 , marqueur pan leucocytaire, CD34 marqueur des progéniteurs hématopoïétiques primitifs et des cellules endothéliales, CD14 ou CD11b marqueurs exprimés de manière prédominante sur les monocytes et macrophages qui co-expriment aussi le CD45 , ces cellules étant les contaminants les plus probables des cultures de CSMh, CD79a ou CD19, marqueurs des lymphocytes B qui co-expriment le CD45 qui peuvent aussi adhérer et rester en vie grâce à leurs interactions avec les CSMh. Par consensus, le marqueur HLA-DR doit être considéré négatif sur des CSMh non activées, la nomenclature devant préciser le type d'activation ou de stimulation ayant pour conséquence la surexpression du HLA-DR.

Marqueurs Exprimés >95%	Marqueurs non exprimés <2%
CD105 (endogline, SH2)	CD45
CD73 (SH3, SH4)	CD34
CD90 (thy-1)	CD14 (CD45+)
	CD11b (CD45+)
	CD79a (CD45+)
	CD19 (CD45+)
	HLA DR (CSM non activées)

Tableau 1.1 *Marqueurs de surface différentiels pour la caractérisation des CSM* Les CSM se caractérisent par l'expression de certains marqueurs mais surtout par l'absence de marqueurs hématopoïétiques (CD45 et sous populations) et de marqueur des cellules souches (CD34)

Enfin, elles doivent pouvoir être différenciées *in vitro* en utilisant des milieux standards de différenciation : en adipocytes, révélé par un marquage à Oil Red O, en ostéoblastes, révélé par du Rouge Alizarin ou par le marquage de Von Kossa et enfin en chondroblastes révélés par marquage au bleu Alcian ou par marquage immunohistochimique du collagène type II. De plus, il convient aussi d'être prudent avec les lots de cellules cultivées extensivement. En effet, des altérations génétiques peuvent survenir pouvant entraîner un phénomène de transformation, identifié dans notre laboratoire dans le cas de CSMm ce phénomène a été décrit par l'équipe de Rubio (Rubio *et al*, 2005), mais cet article a été rétracté en 2010 car certaines des expériences de transformations spontanées n'ont pu être reproduites et ont été attribuées à des contaminations des cultures . Il convient malgré tout de faire preuve d'une grande prudence dans l'utilisation de ces cellules dans un contexte clinique.

Enfin, il est important de noter que la moelle osseuse ne constitue pas le seul tissu d'où peuvent être isolées des CSM répondant à la définition officielle. Il a été établi que des CSM peuvent aussi être dérivées du tissu adipeux, du tendon, de la peau, de l'os, du muscle, du cerveau, des reins et autres organes (Meirelles & Nardi, 2009). Toutefois, il semble que leur potentiel de différenciation soit différent dépendant de l'organe d'origine des cellules. De plus, lors de l'utilisation des CSM isolées de ces organes, le nom du tissu d'origine doit apparaître dans le nom complet.

1.2.2. Caractéristiques physiologiques

La moelle osseuse est une formidable usine de production des cellules sanguines : les érythrocytes, les plaquettes, les lymphocytes B, prennent naissance au cœur de nos os (figure 1.1).

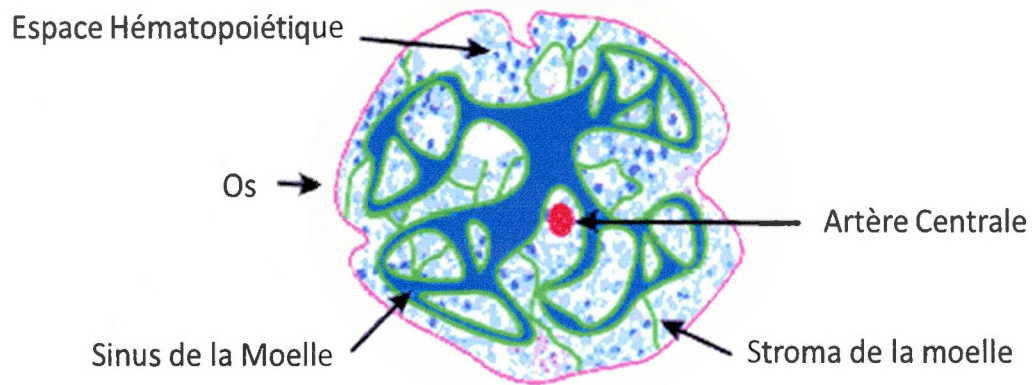


Figure 1.1 : Populations de la moelle osseuse Représentation schématique de la section transversale d'un os long montrant la structure de la moelle osseuse. Les espaces hématopoïétiques sont organisés sous forme de cordes par les cellules stromales (en vert) et contiennent des foci distincts de développement d'érythrocytes et de granulocytes dispersés parmi des précurseurs hématopoïétiques immatures. Les cellules sanguines matures entrent dans la circulation générale en migrant au travers de l'endothélium du sinus de la moelle. (Adapté de (Dunsmore & Shapiro, 2004).)

Cette réserve de cellules souches hématopoïétiques est située au centre d'une structure tissulaire bien caractérisée, le stroma, qui comprend aussi d'autres types cellulaires comme des adipocytes, cellules réticulaires, macrophages, cellules endothéliales vasculaires, cellules de muscle lisse et aussi les CSM (Clark & Keating, 1995) (figure 1.2). Ces dernières représentent à peine 0.001% à 0.01% des cellules nucléées de la moelle osseuse (Pittenger, 1999), mais leur rôle est loin d'être négligeable. L'une des fonctions principales des CSM de la moelle est de fournir un environnement approprié pour l'hématopoïèse, et ce par le jeu d'interactions cellule-cellule ainsi que par la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines tels que le M-CSF, SCF, FLT3 ligand, IL-6-7-8-11-12-14 et 15 (Deans & Moseley, 2000). Elles sont impliquées dans la lymphopoïèse (Torlakovic *et al*, 2005), notamment la maturation des cellules B (Milne *et al*, 2004), et la maturation extra thymique des lymphocytes T (Barda-Saad *et al*, 1996).

La moelle osseuse est aussi un acteur prépondérant de certains types de réponses immunitaires. Elle est le site privilégié d'induction de la réponse adaptative aux antigènes transportés par le sang, mais est aussi le siège de recrutement central privilégié des cellules T mémoires CD8⁺ (Mazo *et al*, 2005) et ce par le biais de la chémokine SDF-1 qui se trouve être abondamment sécrétée par les CSMs. D'autres études semblent suggérer que les cellules stromales peuvent migrer vers les sites de dommage tissulaire et de cicatrisation et participer aux mécanismes de réparation. En effet, lors d'un dommage tissulaire, la voie de signalisation de TGF β est activée et cette dernière est connue pour promouvoir la différenciation des CSM (Liu *et al*, 2006). Les 3 mécanismes de réparation semblant être impliqués incluent (i) la différenciation des CSM en cellules présentant le phénotype des cellules endommagées (ii) la sécrétion de facteurs de croissance et de cytokines qui améliorent les capacités de réparation des tissus endommagés (Prockop, 2003), et (iii) des mécanismes de fusion cellulaire (Spees *et al*, 2003).

Il a aussi été proposé que les cellules stromales puissent migrer vers le site de tumeurs et participer à leur développement. En effet, le microenvironnement d'une tumeur solide présente de nombreuses analogies avec celui de tissus stressés et endommagés. Selon les modèles envisagés, leur présence s'avère parfois favorable à la croissance tumorale (Djouad *et al*, 2003), mais dans d'autres cas un puissant effet antitumoral a pu être observé (Khakoo *et al*, 2006). Il reste toutefois difficile d'établir un parallèle entre ces modèles et le comportement physiologique des CSMh puisque, jusqu'à maintenant aucune preuve n'a pu être apportée de leur migration à partir de la MO sur le site de tumeurs spontanées chez l'homme.

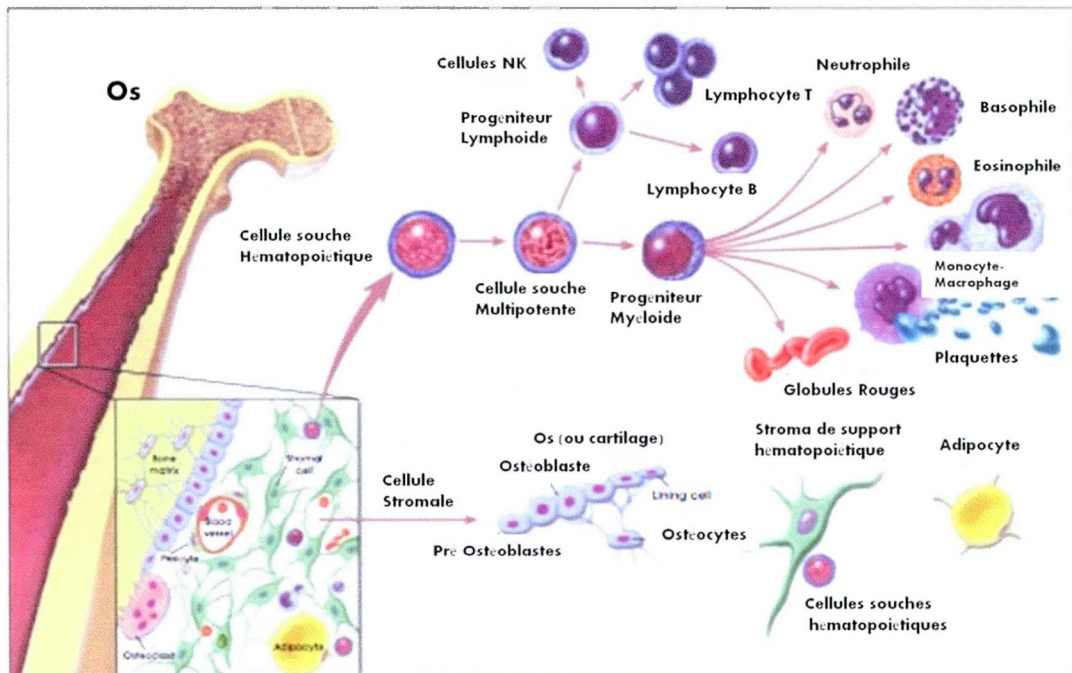


Figure 1.2 : Différenciation des cellules stromales mésenchymateuses multipotentes et des cellules souches hématopoïétiques (Adapté de The Adult Stem Cell. In Stem Cell Information. Bethesda, MD: National Institutes of Health, 2009 disponible sur <http://stemcells.nih.gov/info/scireport/pages/chapter4.aspx>.)

1.2.2.1. Plasticité et potentiel de cellules souches

Un des aspects les plus remarquables des CSMh est leur plasticité. Elles ont déjà intrinsèquement la possibilité de se différencier en lignées mésenchymateuses comme les adipocytes, ostéoblastes et chondrocytes, d'où leur nom, mais de nombreuses études ont pu démontrer leur différenciation en cardiomyocytes (Orlic *et al*, 2001), cellules musculaires (Ferrari *et al*, 1998), hépatocytes (Theise *et al*, 2000) et même dans certains modèles en cellules ayant des propriétés neuronales (Neirinx *et al*, 2013) (figure 1.3). Il est important de rappeler que les nombreuses études sur le sujet ont souvent entraîné une confusion entre ce qui se passe par exemple pour les cellules d'origine murine et les cellules d'origine humaine.

De plus, certains résultats encourageants *in vitro* n'ont pas toujours pu être traduits par une réussite équivalente *in vivo*.

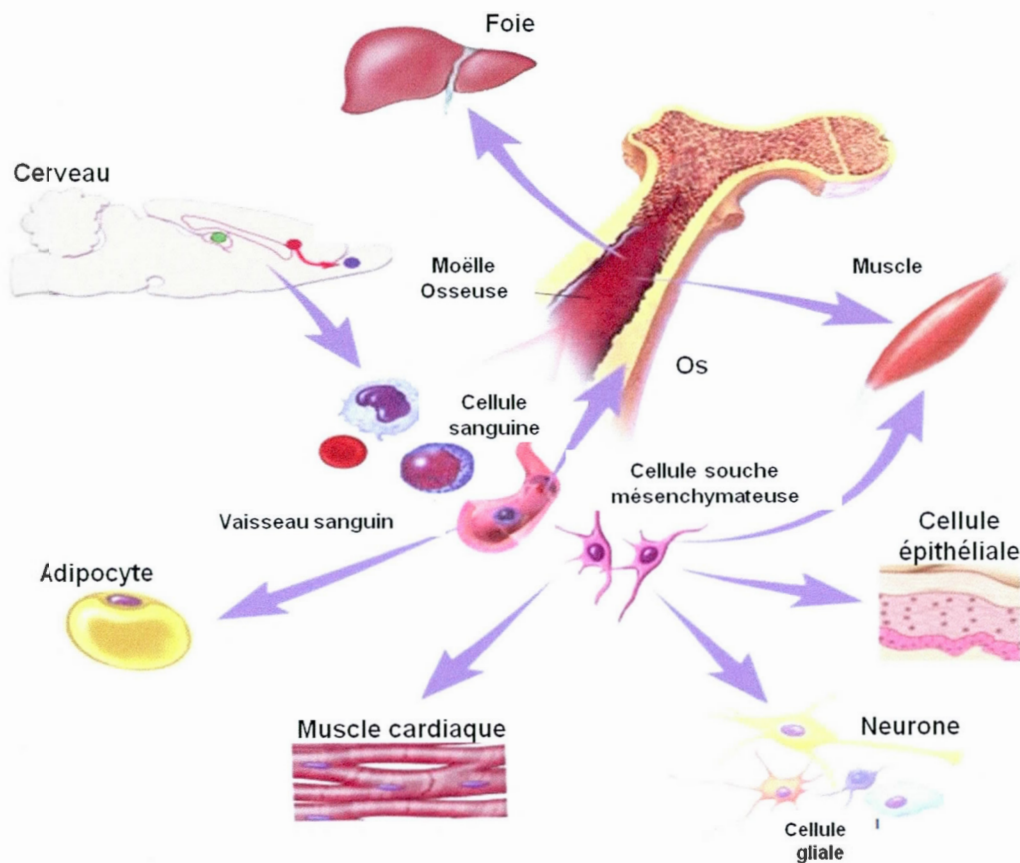


Figure 1.3 : *Plasticité potentielle chez les cellules souches non humaines.* La moelle osseuse est une source complexe de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules stromales qui présentent des potentiels de différenciation variés (Adapté de ©2001 Terese Winslow, Lydia Kibiuk, Caitlin Duckwall)

1.2.2.2. Potentiel migratoire et recrutement

Les CSM ont la capacité d'intervenir dans les phénomènes de réparation tissulaire. Ces cellules ont de plus un effet trophique sur la cicatrisation suite à une blessure par exemple, ce qui présente un intérêt thérapeutique additionnel (Caplan & Dennis, 2006). De nombreuses études ont pu démontrer une augmentation de la vitesse de guérison d'un tissu cardiaque ayant subi un infarctus en présence de CSMh (Gnecchi *et al*, 2008; Kinnaird *et al*, 2004). Il a été démontré sans équivoque que l'effet observé était dû à la sécrétion paracrine de certaines molécules par les CSMh. Des effets équivalents peuvent aussi être observés en utilisant le surnageant de CSMh cultivées dans des conditions d'hypoxie équivalentes à celles présentes dans un tissu cardiaque ischémiq. D'autres études invoquent la relation de CSM et des péricytes avec le tissu endothélial environnant (Meirelles *et al*, 2009). En effet lors d'une blessure, une forte apoptose cellulaire a lieu localement avec pour conséquence l'activation des cellules endothéliales après sécrétion dans le milieu du VEGF. À leur tour, les péricytes et CSM présents sont activés suite à la perte de contact avec les cellules endothéliales et donc prolifèrent, produisant alors un ensemble de facteurs paracrins facilitant la réparation tissulaire, mais aussi modulant la réponse immunitaire et l'inflammation. Elles peuvent éventuellement se différencier en cellules du tissu environnant.

Par le biais de mécanismes similaires à la réparation tissulaire, les CSM ont la propriété de favoriser l'angiogenèse dans de nombreux contextes. Par exemple, l'injection de cellules stromales murines dans du Matrigel chez des souris induit une forte vascularisation de l'implant ainsi généré dans les semaines suivantes (Al-Khaldi *et al*, 2003b). D'autres modèles d'ischémies chez le rat montrent là aussi une récupération presque complète des animaux suite à l'injection sur le site ischémiq de CSMr (Al-Khaldi *et al*, 2003a). Les mécanismes impliqués semblent principalement de type paracrins, toutefois la présence des cellules sur le site reste essentielle et dans le cas de modèles murins notre laboratoire a pu montrer une différenciation *in vivo* des CSM en cellules endothéliales. Cette différenciation reste toutefois anecdotique et n'explique pas à elle seule le phénomène. Notre étude dans ce présent projet consiste à identifier plus en détail les mécanismes impliqués dans cette néovascularisation.

1.2.3. Implication dans d'autres mécanismes physiologiques ou pathologiques

1.2.3.1. Rôle immunologique

Les CSM ont des propriétés immunosuppressives. Là encore, cette propriété particulière peut avoir un impact positif (notion de donneur universel, limitation de l'inflammation lors de la réparation tissulaire, traitement de maladies auto-immunes), mais peut aussi se montrer nocive (facilitation de la croissance tumorale). Il a été montré qu'*in vitro*, des cellules stromales inhibaient la prolifération des lymphocytes mis en contact avec des cellules présentatrices d'antigènes (Blanc *et al*, 2003). Cet effet immunosuppresseur semble être médié principalement par des cytokines et chimiokines, telles que le PGE2, l'HGF, le TGF β 1 et l'IDO (Pommey *et al*, 2006), sécrétés par les cellules stromales, mettant encore une fois en avant les propriétés de leurs fonctions paracrines (Tyndall *et al*, 2005). De plus, cet effet a été confirmé dans de nombreuses autres approches *in vitro* avec d'autres cellules du système immunitaire, par exemple dans une réaction lymphocytaire mixte, la suppression de réponse est notée lorsque l'on ajoute les MSC, la prolifération des lymphocytes est en effet fortement diminuée (Uccelli *et al*, 2007) (figure 1.4).

Dans le cadre de greffes de moelle osseuse allogénique dans des modèles murins il est montré que l'injection de CSM au moment de la déclaration d'une GvHD (maladie du greffon contre l'hôte) permet un arrêt de l'évolution de la maladie voir une réversion complète de la pathologie (Le Blanc *et al*, 2004). L'utilisation des CSMh est en cours d'essai clinique chez l'humain pour le traitement de la GvHD (voir tableau 1.2). Il faut noter toutefois, qu'en fonction du contexte, le phénomène d'immunosuppression n'est pas toujours observé. Dans le cadre de modèles murins de greffe de cellules allogéniques, les mécanismes de rejets sont conservés (Eliopoulos *et al*, 2005). Une façon d'interpréter leur rôle immun modulateur passe aussi par la découverte de fonctions de présentation de l'antigène. Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que dans un contexte où les cellules sont chargées avec un peptide antigénique, une réponse immunitaire de type cytotoxique est alors observée. Cet effet a été confirmé *in vitro* avec des cellules humaines (Romieu-Mourez *et al*, 2007).

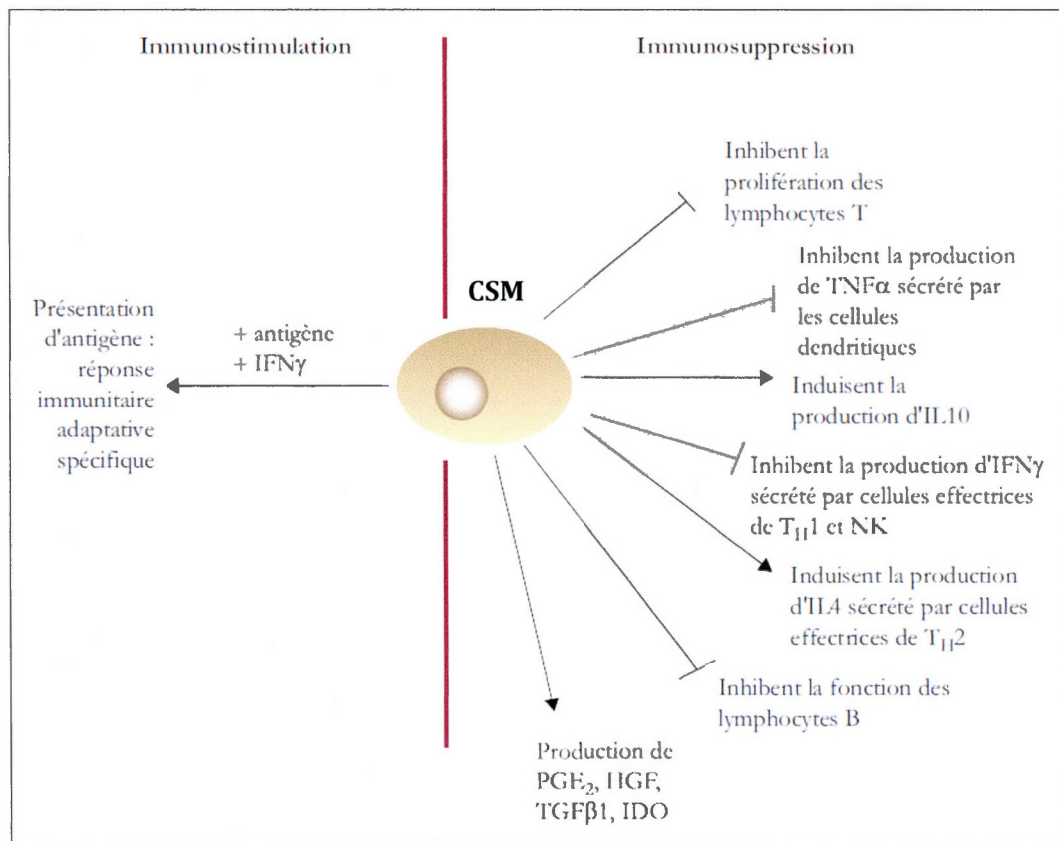


Figure 1.4 : *Propriétés immunologiques des CSM* (adapté de (Pomme *et al*, 2006).)

Enfin, il est important de noter que de nombreux indices indiquent que les CSM peuvent aider au développement des vaisseaux lymphatiques lors de la lymphangiogénèse. (Alitalo *et al*, 2005). Cela peut présenter des avantages lors d'œdèmes lymphatiques car leur injection locale permet la reconstitution d'un maillage lymphatique satisfaisant (Zhou *et al*, 2011).

1.2.3.2. Rôle dans le développement tumoral

Dans des modèles murins, nous avons pu constater dans notre laboratoire que l'injection concomitante des cellules stromales avec des cellules cancéreuses induisait un

développement tumoral plus rapide que dans le cas de cellules tumorales injectées seules (Annabi *et al*, 2004). Des observations similaires ont pu être notées dans notre laboratoire sur un modèle murin de glioblastome en Matrigel *in vivo* (figure 1.5). *In vitro*, des observations similaires ont permis de visualiser la motilité de ces cellules dans le cadre d'expériences de migration cellulaire. Ces résultats indiquent que les CSM aident au développement tumoral : les tumeurs sécrètent des facteurs de détresse dus à l'hypoxie, mais aussi par des facteurs paracrins intrinsèques à la tumeur, ce qui a pour effet de recruter des CSM sur site qui aident à la néo-vascularisation tumorale que ce soit par des mécanismes directs (différenciation en cellules endothéliales) ou indirects (recrutements de cellules endothéliales via des facteurs paracrins sécrétés par les CSM)(Al-Khaldi *et al*, 2003a).

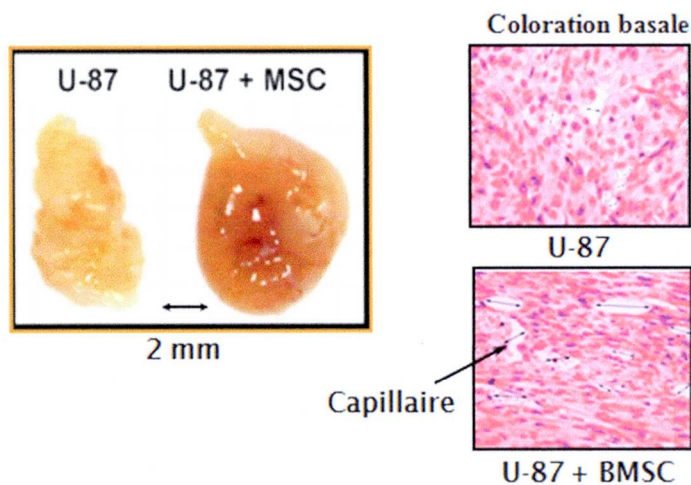


Figure 1.5: Néo vascularisation tumorale induite par les CSM *in vivo*. Des souris C57Bl/6 sont injectées soit avec des cellules tumorales U87, soit avec le même nombre de cellules U87 complémentées avec des cellules stromales de souris. L'ajout des CSM induit une vascularisation bien plus forte de la tumeur et entraîne une masse tumorale supérieure.

Un autre facteur important du développement tumoral est la capacité de développer des métastases. Bien souvent les cellules métastatiques circulent via les vaisseaux lymphatiques entraînant le développement de tumeurs secondaires dans les ganglions lymphatiques (cancer du sein, cancer du poumon). Ce type de métastase constituant un pronostic négatif quant à la survie du patient dans de nombreux types de cancers. Là encore, les CSM peuvent jouer un rôle dans le développement métastatique du fait de leur possible initiation de la lymphangiogenèse (Adams & Alitalo, 2007). Enfin et de manière plus inquiétante, il est arrivé de voir un développement de tumeurs dans des modèles murins où étaient seulement injectés des cellules stromales. Cette croissance tumorale a pu être identifiée ultérieurement comme étant attribuable à une instabilité chromosomique des CSM gardées trop longtemps en culture. (communication non publiée). Ce phénomène de transformation a aussi été décrit dans le cas des CSMh *in vitro* (Røsland *et al*, 2009).

Dans le cas de tumeurs solides spontanées humaines, les fibroblastes associés aux tumeurs ou aux carcinomes (FAC) jouent un rôle important dans la croissance des tumeurs épithéliales solides. Des travaux récents ont montré que les CSMh peuvent être une source de FACs. (Mishra *et al*, 2008). Il avait déjà été démontré que les CSMh sont localisées naturellement sur les sites de l'hématopoïèse (moelle osseuse) où elles ont été identifiées initialement, mais aussi sur les sites d'inflammations, de blessures et surtout de manière peut être plus intéressante au niveau des tumeurs solides. La capacité des CSMh à migrer sur le site de tumeurs peut être exploitée à des fins thérapeutiques. Les CSMh pourraient être utilisées comme véhicule de transport de médicament au cœur même de la tumeur par le biais de techniques de thérapie cellulaire. De nombreuses études ont montré avec succès l'utilisation de cette approche dans des modèles murins de glioblastome et de mélanome (Nakamizo *et al*, 2005; Studeny *et al*, 2002; Stagg *et al*, 2004). Toutefois, d'autres études dans des modèles murins équivalents montrent une contribution des CSM à la croissance tumorale (Djouad *et al*, 2003). Ces résultats contradictoires mettent en relief des mécanismes d'intervention des CSM que ce soit dans un contexte physiologique normal ou pathologique. Leur impact peut donc s'avérer positif ou délétère selon les circonstances. Même si le rôle exact des CSM dans la croissance tumorale ou encore dans la dissémination des métastases reste encore à être élucidé, il demeure fondamental de continuer l'étude de ces cellules dans le cadre de

thérapies anticancéreuses indirectes (cellules utilisées comme véhicules de médication anticancéreuse) ou directes (ciblage des cellules stromales des tumeurs pour fragiliser le développement tumoral).

1.2.3.3. Maladies liées au dysfonctionnement des CSMh : Le cas de la maladie de Gaucher

Une autre façon de connaître l'importance du rôle physiologique des CSMh est de trouver des exemples de maladies dans lesquels elles présentent un dysfonctionnement. Dans le cas de la maladie de Gaucher par exemple, des études récentes montrent que les symptômes seraient attribuables à un dysfonctionnement des CSM *in situ* dans la moelle osseuse (Campeau *et al*, 2009; Lecourt *et al*, 2013). La maladie de Gaucher est une maladie génétique autosomale récessive due à la mutation du gène codant pour la β -glucocérobrosidase (GBA) qui se manifeste par une déficience dans le stockage lysosomal. Cela entraîne une accumulation significative de glucocérobroside dans les cellules de lignée phagocytaire, principalement des macrophages, mais aussi des complications osseuses comme des fractures, osteopenia et infiltrations de la moelle osseuse. Le type 1 de la maladie qui est le plus courant, cause une hépatosplénomégalie, un dysfonctionnement de la moelle osseuse et des altérations du squelette. La première étude démontre une altération du sécrétome des CSMh chez les patients atteints du type 1 (Campeau *et al*, 2009). Leurs cellules stromales semblent normales par ailleurs et répondent aux critères décrits dans la littérature (Dominici *et al*, 2006). Leur sécrétome, déterminé par une technique de quantification des cytokines au niveau protéique ou transcriptionnel, montre une augmentation de la production de nombreuses cytokines inflammatoires en particulier le $\text{TGF}\alpha$, l'IL-8 et le CCL2, ce dernier pouvant être directement relié à l'augmentation de la présence de S1P dans les cellules et corrèle avec les implications osseuses de la maladie de Gaucher. La seconde étude (Lecourt *et al*, 2013), montre clairement que dans la moelle osseuse de patients souffrant de la maladie de Gaucher, alors que les cellules souches hématopoïétiques présentent un fonctionnement normal, les CSMh quant à elles confirment une altération de leur fonctionnement quant à leur capacité de différenciation ostéoblastique et montrent ainsi leur contribution dans les problèmes osseux des patients Gaucher.

1.2.4. Potentiel thérapeutique des CSMh

Aux vues des nombreuses propriétés souvent contradictoires en apparence des CSMh, de nombreuses approches thérapeutiques potentielles ont été suggérées. Il convient toutefois de rester prudent, surtout concernant leur potentielle d'implication dans le développement tumoral. D'autre part, les observations faites dans les modèles animaux ne se transposent pas nécessairement automatiquement aux modèles humains. Il est parfois difficile dans la littérature de bien identifier le type de modèle (humain ou animal) et les nombreuses revues sur la vaste thématique des CSM mélangent allègrement les conclusions indépendamment du modèle étudié (Voir Tableau 1.2 et Tableau 1.3).

Maladie	Espèce	Route d'administration	Mécanisme de l'effet des CSM	Source des Cellules	REF
Lupus systémique érythémateux	Souris	Veine de la queue	Suppression des Th17 et augmentation des cellules Treg CD4+CD25+FoxP3+ Diminution de l'expansion cellulaires des Th1 et Th17 et induction ou génération <i>de novo</i> des cellules Treg CD4+CD25+FoxP3+	CSM dérivées de la moelle osseuse murine	1
Arthrite Rhumatoïde	Souris	Intrapéritonéale	Diminution de l'expansion cellulaires des Th1 et induction ou génération <i>de novo</i> des cellules Treg CD4+CD25+FoxP3+	CSM dérivées de tissu adipeux humain	2
Diabète autoimmun de Type 1	Souris	Veine de la queue	Fournit des facteurs de croissance et/ou des récepteurs d'adhésion essentiels	CSM dérivées de la moelle osseuse murine	3
Défauts du système hématopoïétique	Souris	Veine de la queue	Expression diminuée de cytokines inflammatoires telles que TNF α , IFN γ et IL-12	CSM dérivées de la moelle osseuse humaine	4
Maladie du greffon contre l'hôte	Souris	Veine de la queue	Production d'oxyde nitrique induit par cytokine via la suppression de la prolifération des cellules T médiée par les CSM	CSM dérivées de tissu adipeux murin	5
Maladie du greffon contre l'hôte	Souris	Veine de la queue		CSM dérivées de la moelle osseuse murine	6
Infarctus du myocarde	Rat	Transplantation de monocouche de CSM	sécrétion à haute dose de cytokines angiogénique et antiapoptotiques	CSM dérivées de tissu adipeux de rat	7
Infarctus du myocarde	Porc	Transendocardiaque	stimulation des cellules souches cardiaques endogènes	CSM dérivées de la moelle osseuse humaine	8
Maladie de Parkinson	Rat	Injection intranasale au cerveau	Diminution de la production de cytokines inflammatoires	CSM dérivées de la moelle osseuse de rat	9
Lésion de la moelle épinière	Rat	Transplantation de matrice 3D contenant des CSM	dépôt de fibronectine et diminution d'expression du TNF α et IL-1	CSM dérivées de la moelle osseuse de rat	10
Maladie inflammatoire de l'intestin	Souris	Intrapéritonéale	Diminution de l'activité myéloperoxydase du colon et de l'infiltration de neutrophiles	CSM dérivées de ESC humaines	11
Fibrose hépatique	Souris	Veine de la queue	Expression accrue de MMP-9 et MMP-14 et diminution d'expression du TGF- β 1	CSM dérivées de la moelle osseuse murine	12
Lésion pulmonaire	Souris	Veine jugulaire	le IL1RN exprimé par les CSM antagonise la fonction de IL-1 α et le relargage de TNF- α par les macrophages Inhibition de la voie d'inflammation de l'allergie respiratoire médiée par Th2 et promotion d'un phénotype Th1 des lymphocytes T CD4+ antigène-spécifiques via un mécanisme IFN γ - Contribution à l'initiation des cals par l'expression de BMP-2 et des niveaux réduits de TNF- α et IL-1	CSM dérivées de la moelle osseuse murine	13
Lésion pulmonaire aigue	Souris	Veine de la queue		CSM dérivées de la moelle osseuse murine	14
Fracture osseuse	Souris	Veine de la queue		CSM dérivées de la moelle osseuse murine	15
Abrasion de la cornée	Souris	Intrapéritonéale ou intraveineuse	Sécrétion de la protéine anti-inflammatoire TSG-6	CSM dérivées de la moelle osseuse murine	16
Plaie de la peau	Souris	Veine de la queue	Suppression des cellules Th17 et augmentation de l'expression de IL-10	CSM dérivées de la gencive humaine	17
Plaie de la peau	Souris	Intradermique	Effet immunosuppresseur et relargage de cytokines de réparation tissulaire	CSM dérivées de la moelle osseuse murine et fibroblastes	18

Tableau 1.2 : Traitement de maladies par les cellules stromales mésenchymateuses dans des modèles animaux, références : 1(Sun *et al*, 2009) 2(González *et al*, 2009) 3 (Fiorina *et al*, 2009) 4 (Delalat *et al*, 2009) 5 (Yañez *et al*, 2006) 6 (Ren *et al*, 2008) 7 (Miyahara *et al*, 2006) 8 (Hatzistergos *et al*, 2010) 9 (Danielyan *et al*, 2011) 10 (Zeng *et al*, 2011) 11

(Sánchez *et al*, 2011) 12 (Sakaida *et al*, 2004) 13 (Ortiz *et al*, 2007) 14 (Goodwin *et al*, 2011) 15 (Granero-Moltó *et al*, 2009) 16 (Roddy *et al*, 2011) 17 (Zhang *et al*, 2010) 18 (Chen *et al*, 2009) adapté de : Concise Review : Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine : Emergine Issues, Ren G *et al*, Stem Cells Translational Medicine 2012; 1 :51-58

Maladie	# Conception de l'essai	Effets	Phase de l'essai clinique	Masse Cellulaire (hCSM/kg)	Source de CSM	REF
GvHD	Perfusion systémique 12 (veine périphérique)	Réponse réduite : diminution des stade de GvHD, aucune toxicité perfusionnelle aigue ou autre identifiée	Phase II	2.0×10^5 , 8.0×10^5	CSM dérivées de moelle osseuse allogénique (prochymal)	1
GvHD	Perfusion systémique 32 (veine périphérique)	Réponse réduite, pas de toxicité perfusionnelle ni formation de tissus ectopiques	Phase II	2.0×10^5 , 8.0×10^5	CSM dérivées de moelle osseuse allogénique (prochymal)	2
Infarctus du Myocarde	Perfusion systémique 53 (veine périphérique)	Réduction des épisodes de tachycardie ventriculaire et fonction pulmonaire améliorée, meilleur score global des symptômes, aucun effet défavorable	Phase I	0.5×10^5 , 1.6×10^5 , 1.6×10^5	CSM dérivées de moelle osseuse allogénique (prochymal)	3
GvHD	Perfusion systémique 46 (veine périphérique)	Diminution des stades de GvHD, bien toléré sans effet défavorable	Phase I	$2.0 - 5.0 \times 10^5$	CSM dérivées de moelle osseuse allogénique	4
Atrophie multisystémique	Perfusion systémique (veine périphérique) ou 29 locale (veine portale)	Augmentation significative du glucose dans la région du cerveau, aucun effet défavorable relié à la thérapie cellulaire	Phase II	4.0×10^7 , nb total de CSMh par injection	CSM dérivées de moelle osseuse autologue	5
Insuffisance hépatique	Perfusion locale (artère hépatique) 105	MELD, pas d'effet secondaire sérieux ni complication	Phase I-II	Inconnu	CSM dérivées de moelle osseuse autologue	6
Cirrhose du foie	Perfusion systémique (veine périphérique) ou 8 locale (veine portale)	prothrombine et de la créatinine sérique, augmentation de l'albumine sérique, aucun effet défavorable	Phase I-II	4.0×10^7 , nb total de CSMh par injection	CSM dérivées de moelle osseuse autologue	7
Ischémie critique du membre et ulcère du pied diabétique	Injection locale N/A (intramusculaire)	Amélioration du temps d'éveil sans douleur, AVI, pression d'oxygène transcutanée, aucun effet défavorable sérieux	Phase I	Inconnu	CSM dérivées de moelle osseuse autologue	8
Défaut Parodontal	Injection locale (surface de la racine et espace 1 adjacent endommagé)	Réduction de la profondeur de sondage et gain de la capacité d'attachement. Disparition de saignement et de la mobilité de la dent. Aucun effet	Phase	Inconnu	CSM dérivées de moelle osseuse autologue de la crête iliaque	9
Lésion chronique de la moelle épinière	Injection locale 64 (intrathecal)	Aucune amélioration significative des mesures cliniques, pourrait avoir des effets secondaires	Phase I-II	Inconnu	CSM dérivées de moelle osseuse autologue	10

Tableau 1.3 : Exemples d'essais cliniques utilisant des traitements à base de CSM publiés sur *clinicaltrials.gov* Références : 1 (Prasad *et al*, 2011) 2 (Kebriai *et al*, 2009) 3 (Hare *et al*, 2009) 4 (Lazarus *et al*, 2005) 5 (Lee *et al*, 2008) 6 (Peng *et al*, 2011) 7 (Kharaziha *et al*, 2009) 8 (Lu *et al*, 2011) 9 (Yamada *et al*, 2006) 10 (Kishk *et al*, 2010) adapté de : Concise Review : Mesenchymal Stem Cells and Translational Medicine : Emergine Issues, Ren G *et al*, Stem Cells Translational Medicine 2012; 1 :51-58

1.2.4.1. Exemples d'approches en thérapie cellulaire

Des études (Schuleri *et al*, 2007) ont révélé un rôle déterminant des CSM dans la réparation cardiaque, notamment en co-injectant ces cellules directement sur une zone d'infarctus chez le rat. (Miyahara *et al*, 2006). Toutefois, l'impact sur la guérison post-infarctus est largement attribué au sécrétome des CSM car le même effet thérapeutique est observé seulement en utilisant du milieu conditionné de CSM cultivées en condition hypoxique (Gnecchi *et al*, 2008). Ce phénomène est cohérent avec la faculté des CSM à sécréter de façon paracrine des molécules chimiotactiques (figure 1.6). Ces dernières peuvent alors recruter des facteurs de réparation tissulaires ainsi que des cellules endothéliales, en particulier lorsque les cellules ont été placées auparavant en milieu hypoxique (Al-Khaldi *et al*, 2003a).

L'utilisation des CSMh dans le traitement d'osteogenesis imperfecta (OI) lors de l'étude clinique effectuée par l'équipe de recherche de Horwitz s'est avérée encourageante (Horwitz *et al*, 2002). L'OI est une maladie génétique aussi appelée maladie de l'os de verre qui se traduit par une fragilité extrême des os. Les patients atteints naissent avec des tissus connectifs déficients et avec un collagène de type-1 dysfonctionnel. À ce jour, il n'y a pas de traitement connu. L'idée de l'équipe d'Horwitz est de transplanter des CSMh allogéniques avec pour objectif de restituer les fonctions d'ostéogenèse chez les jeunes patients OI de l'étude. Pour 5 des 6 patients traités, les améliorations de croissance et de solidité osseuse vont de 60% à 94% par rapport à la croissance attendue chez ces patients.

D'autres études ont aussi montré un impact favorable des CSM pour la réparation du système nerveux central lors de maladies neurodégénératives (Danielyan *et al*, 2011; Kan *et al*, 2007). Plusieurs théories viennent à l'appui des effets bénéfiques notés dans différentes études : le remplacement cellulaire via la différenciation des CSM en neurones ce qui constitue un réel avantage à long terme, la sécrétion de facteurs trophiques qui peuvent expliquer les améliorations transitoires en stimulant la croissance des neurones, la multiplication des cellules endogènes et la régénération de la fibre nerveuse et enfin l'immunomodulation (figure 1.6). De nombreux articles mentionnent des mécanismes d'inflammation pour expliquer la neurodégénération, de cette manière l'ajout de cellules immunosuppressives

comme les CSM contribuerait à contrôler l'inflammation et donc à diminuer les symptômes neurodégénératifs.

De la même manière, les CSM ont été utilisées pour vérifier leur capacité à réparer le système nerveux périphérique comme dans le cas de déficience de la moelle épinière (Kishk *et al*, 2010) où les différentes propriétés des CSM sont, là aussi, mises à jour et impliquent à la fois la cellule elle-même et son potentiel de différenciation, son effet paracrin chemoattractant, stimulant de la croissance cellulaire, mais aussi immunosuppresseur.

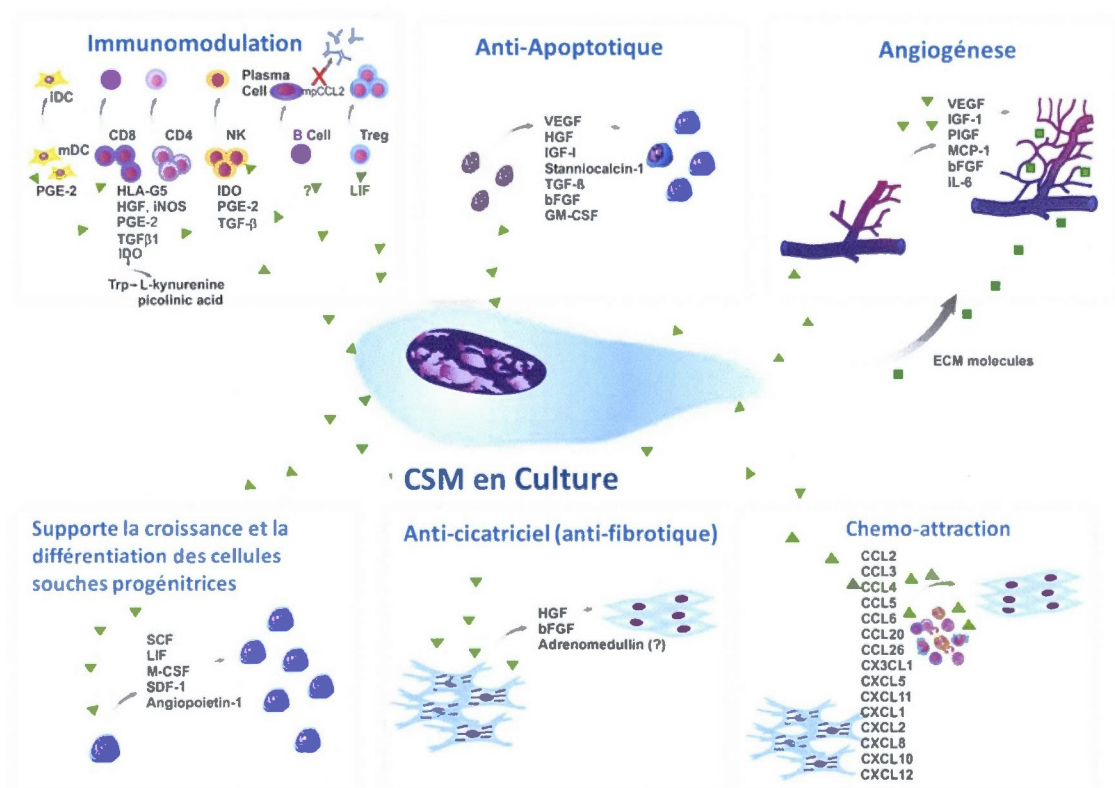


Figure 1.6 : Effets paracrins des CSM mises en culture : La sécrétion d'une vaste gamme de molécules bioactives semble constituer le mécanisme principal par lequel les CSM sont capables de générer leurs effets thérapeutiques. Ces molécules sécrétées se classent en 6

catégories principales. Ne sont représentées sur le graphe que les plus connues d'entre elles et ne constituent pas une liste exhaustive. (Adapté de (Meirelles *et al*, 2009).)

1.2.4.2. Approches de thérapie génique

Puisque les CSM ont déjà montré leur facilité d'utilisation et leurs capacités thérapeutiques intrinsèques, pourquoi ne pas aller plus loin dans leur utilisation ? En parallèle aux recherches sur leurs fonctions et propriétés naturelles, une autre branche de recherche se concentre sur l'utilisation des CSM comme véhicule de molécules thérapeutiques (Eliopoulos *et al*, 2003). Les CSM constituent un véhicule idéal pour la thérapie génique, elles peuvent être relativement facilement dérivées de la moelle osseuse, placées en culture et amplifiées. En quelques mots, la thérapie génique consiste à modifier le génome des cellules de manière à corriger une anomalie ou une pathologie ou encore pour s'en servir comme « usine de production » d'une ou de plusieurs molécules d'intérêt thérapeutique. Il peut s'agir de modifier par exemple directement les cellules du patient qui sont déficientes pour l'expression d'un gène et ainsi corriger son activité (Cavazzana-Calvo *et al*, 2000; Aiuti *et al*, 2013) ou encore de se servir de cellules génériques, si possibles autologues, qui seraient modifiées génétiquement afin de sécréter une molécule d'intérêt thérapeutique.

Les principes de la thérapie géniques peuvent être appliqués de manière relativement aisée avec les CSM. En effet elles sont facilement isolables, permettent jusqu'à 40 passages en culture, et de plus se prêtent aisément à des infections aux rétrovirus recombinants pouvant intégrer un gène d'intérêt thérapeutique dans la cellule hôte. D'autres méthodes de transfert de gène peuvent également être envisagées. Les cellules peuvent être celles mêmes du patient qui seront modifiées *ex vivo*. Il est même envisagé d'utiliser leurs propriétés d'immunosuppression pour mettre au point des cellules génériques qui seraient des donneurs universels, ce qui rendrait les processus de contrôle, de fiabilité et de sécurité beaucoup plus accessibles. Les cellules peuvent ensuite être réinjectées ou placées dans une matrice tridimensionnelle comme le Matrigel ou le « Contigen » qui est injectable chez l'humain (Eliopoulos *et al*, 2004). L'intérêt de l'utilisation d'une matrice est que les CSM permettent

la constitution d'un néo-organe vascularisé et permet ainsi une sécrétion prolongée de la molécule d'intérêt. De plus, les cellules étant autogéniques, il n'y a pas occurrence de rejet immunologique des cellules.

1.2.4.3. Exemples d'approches immunologiques

Les propriétés d'immunomodulation des CSMh sont moins souvent mentionnées dans la littérature car moins étudiées que leurs autres facultés. Cependant, cette propriété a été élégamment exploitée par l'équipe du Dr Le Blanc dans le traitement de la GvHD de type IV (mortelle) chez un enfant de 9 ans (Le Blanc *et al*, 2004). L'injection de CSMh de la mère a conduit de manière spectaculaire à la complète rémission de la GvHD. Ces résultats préliminaires ont été suivis par une étude plus complète sur 55 patients (Le Blanc *et al*, 2008) avec environ la moitié avec des CSMh issues de donneurs ayant un type HLA compatible afin de minimiser les chances de rejet et l'autre moitié des CSMh issues de donneurs de type HLA complètement différent. Plus de la moitié des patients ont pu obtenir une rémission complète de la GvHD et la plus grosse partie des patients restants ont vu leurs symptômes de GvHD passer à un grade beaucoup moins sévère et gérable dans la vie de tous les jours, le résultat n'étant pas corrélé au type HLA injecté. Ces résultats permettent d'envisager l'utilisation de CSMh sans contrainte due au typage HLA, et en tant que « donneuses universelles ».

Enfin, un aspect des CSM, découvert encore plus récemment, met en évidence leur fonction de cellules présentatrices d'antigènes « douces ». En effet, il a été montré *in vivo* et *in vitro* que les CSMm et CSMh pouvaient non seulement monter une réponse immune dans des modèles *in vitro* via leur capacité de présentation d'antigène (Romieu-Mourez *et al*, 2007) mais aussi que cette propriété peut être utilisée *in vivo* dans le cadre de processus de vaccination anticancéreuse par exemple (Stagg *et al*, 2006). Bien sûr, il est nécessaire que les cellules soient stimulées par l'IFN γ afin d'augmenter l'expression du CMH de classe II. Elles sont alors capables de présenter les peptides choisis et la réponse obtenue est considérée comme modérée si on la compare à ce qui peut être obtenu dans des conditions similaires avec des cellules présentatrices d'antigènes classiques, les cellules dendritiques par exemple.

Les CSM présentent le double intérêt d'être obtenues facilement et de pouvoir être modifiées et maintenues en culture. Elles représentent donc une option de vaccination cellulaire pratique et efficace.

1.2.4.4. Approches anticancéreuses

On a pu voir que les cellules stromales participent, de manière soit négative (en favorisant) soit positive (en inhibant), au développement tumoral. Dans le cas où elles participeraient naturellement au développement tumoral et que les cellules stromales sont recrutées par la tumeur afin de lui apporter un soutien « logistique » et tissulaire, cibler ces CSMh afin de les détruire avec les cellules tumorales devient une stratégie pertinente qui permet d'augmenter l'effet thérapeutique tout en minimisant les risques de rechute.

Les CSM peuvent, par exemple, être ciblées par traitement anti-angiogénique. En effet, leur rôle dans la croissance vasculaire grâce à leurs sécrétions paracrines et le support tissulaire qu'elles fournissent aux tumeurs (par exemple via leur différenciation en péricytes) les rendant susceptibles aux traitements anti-angiogéniques (Crisan *et al*, 2008). Lorsque ces cellules sont injectées, elles ont la propriété d'être recrutées aux sites tumoraux (Annabi *et al*, 2004). Cette propriété peut alors être utilisée à notre avantage car ces cellules peuvent alors agir comme cheval de Troie soit pour délivrer *in situ* un médicament anticancéreux, ou encore en sécrétant un composé capable d'activer le système immunitaire du patient contre la tumeur (Stagg *et al*, 2004). Encore une fois, il faut définir de quelle façon se déplace l'équilibre entre les effets négatifs et positifs de ces cellules sur la croissance tumorale.

1.2.4.5. Approches pro-angiogéniques

Quelquesoit le type d'utilisation envisagé pour les CSM, leur capacité à induire une réponse angiogénique est un avantage certain. L'initiation d'une réponse inflammatoire pro-angiogénique est indispensable à la réparation tissulaire et tout facteur pouvant améliorer ce phénomène est un avantage. L'injection directe des CSM sur une zone hypoxique ou ischémique permet de circonvenir la faiblesse ou la lenteur de la réponse naturelle et donc de

restaurer un vaisseau endommagé (Al-Khaldi *et al*, 2003a; Aghi & Chiocca, 2005) ou un tissu cardiaque ayant subi un infarctus.(Orlic *et al*, 2001; Hare *et al*, 2009). Dans certains cas, il est important d'allonger la durée de vie des cellules sur sites car même s'il est envisageable que seuls les facteurs paracrins aient un réel effet, permettre une sécrétion prolongée de ces facteurs est indispensable. Il est possible de définir *in vivo* un support matriciel permettant aux cellules de survivre localement comme en Matrigel (Hughes *et al*, 2010) ou Contigen (Eliopoulos *et al*, 2004), et de profiter ainsi de leurs propriétés intrinsèques à survivre en conditions hypoxiques sévères et ainsi les utiliser dans les nombreuses approches thérapeutiques envisagées dans les paragraphes suivants. Il est essentiel de comprendre ces mécanismes de survie et d'adaptation bénéfiques afin de pouvoir les appliquer de manière optimisée dans des contextes encore plus variés. Ce que ces cellules sécrètent en condition de stress constitue l'élément déclencheur et/ou favorable à tous les phénomènes décrits plus haut et la clé est de comprendre en premier leurs capacités pro-angiogéniques qui sont une combinaison de leurs propriétés paracrines, de différenciation et d'interaction avec la matrice extracellulaire. Toutes les autres propriétés de ces cellules découlent de leur principe premier : l'angiogenèse.

1.3. L'angiogenèse

Dans notre étude, nous nous sommes particulièrement penchés sur les potentiels angiogéniques et vasculo-géniques des CSMh. Notre équipe a montré que les CSM murines cultivées en Matrigel, ce qui se rapproche du modèle physiologique naturel (Hughes *et al*, 2010), sont fortement impliquées dans le développement de vaisseaux sanguins *in vivo* dans le modèle de matrice de Matrigel (Al-Khaldi *et al*, 2003b). De façon cohérente, une co-injection des CSMm avec des cellules tumorales montre une accélération de la croissance tumorale (Annabi *et al*, 2004)

L'angiogenèse est le phénomène par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins sont générés à partir de vaisseaux sanguins préexistants. Ce phénomène se produit de façon physiologique lors de l'organogenèse et de la réparation tissulaire. Un dysfonctionnement de l'angiogenèse peut générer par exemple de l'ischémie ou hypoxie entraînant une dégénérescence tissulaire.

Ce phénomène d'ischémie est fortement impliqué dans la dégénérescence cardiaque ou vasculaire conséquant à une crise cardiaque ou à un caillot veineux ou sanguin. Il est intéressant de noter que les mécanismes cellulaires d'angiogenèse peuvent être détournés de leur fonction première par les cellules tumorales leur assurant ainsi l'apport d'oxygène et de nutriments via la génération de vaisseaux sanguins à partir du réseau existant. Ce phénomène d'angiogenèse tumorale semble être favorisé et amplifié par la présence de cellules stromales comme le montrent des résultats obtenus dans notre laboratoire (figure 1.5).

1.3.1. Angiogenèse physiologique

L'angiogenèse physiologique se produit généralement lors de l'organogénèse, mais aussi lors de la réparation tissulaire à la suite d'une blessure. Il s'agit du phénomène de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (ou néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants et constitue un phénomène physiologique normal. Plusieurs facteurs solubles sont nécessaires à la manifestation des phénomènes d'angiogenèse à savoir les facteurs pro-angiogéniques VEGF, FGF et le PDGF, mais aussi les inhibiteurs des facteurs anti-angiogéniques comme l'angiostatine ou la thrombospondine (figure 1.7). Le système de l'angiopoïétine et ses récepteurs Tie-1 et Tie-2 constituent un autre mécanisme de l'angiogenèse. Durant l'angiogenèse physiologique, des stimuli tels que l'hypoxie peuvent enclencher la cascade d'événements menant à l'angiogenèse. La sécrétion initiale de FGF et VEGF permet la déstabilisation de la membrane et l'initiation du développement des vaisseaux et la prolifération des cellules endothéliales. Les MMPs favorisent le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et augmentent la disponibilité des facteurs de croissance stockés dans la MEC. Lorsque la connexion se fait et que l'hypoxie diminue, la sécrétion de VEGF diminue au profit de la sécrétion du PDGF de l'angiopoïétine et du TGF β 1 qui vont permettre la stabilisation des cellules murales des vaisseaux, des péricytes et des cellules musculaires lisses (figure 1.6).

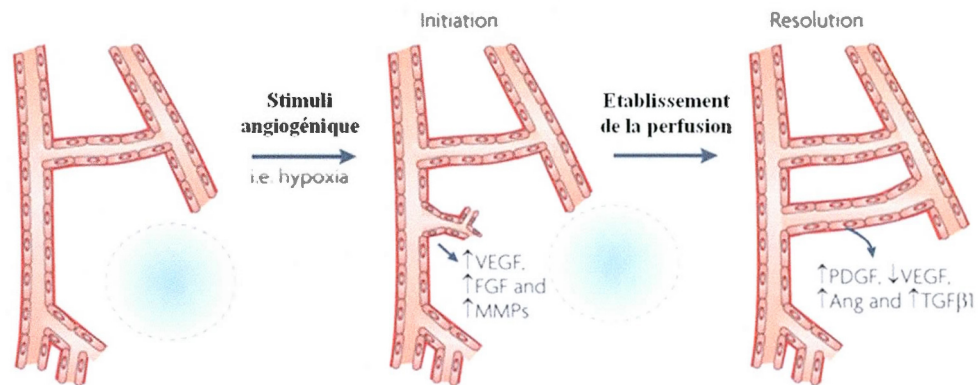


Figure 1.7 : Angiogenèse physiologique : Mécanisme de formation physiologique de nouveaux vaisseaux sanguins suite à un stimulus de type hypoxique. (Adapté (Chung *et al*, 2010).)

1.3.2. Angiogenèse pathologique

Lorsque le phénomène d'angiogenèse ne peut plus répondre de manière adéquate, on entre alors dans un déséquilibre qui peut entraîner différentes pathologies. Une insuffisance de l'angiogenèse est associée à de l'ischémie. Ce phénomène est aussi associé aux complications du diabète et se traduit par des défauts dans la réparation de lésions conséquentes à la maladie (ulcère diabétique). À l'inverse, une suractivité des événements angiogéniques serait associée à des pathologies comme le psoriasis ou encore le phénomène des plaques d'athérosclérose (Folkman, 2007) (tableau 1.4).

Maladie	Symptomes	REFERENCE
Retinopathie diabétique	Perte de vision	1
Diabète	Ischemie sévère et ulcere	2
Arthrite rhumatoïde	Douleur et immobilité du à la destruction du cartilage	3
Plaques d'athérosclérose	Douleurs poitrinaires, dyspnoea	4
Endometriose	Douleurs abdominales et saignement intraperitonéal	5
Maladie de Crohn	Saignement intestinal	6
Psoriasis	Démangeaisons severes persistantes	7
Fibroides utérins	Saignement vaginal, douleurs abdominales	
Hypertrophie bénigne de la prostate	Rétention urinaire	
Cancer	saignements, thrombose, anémie, ascites abnominaux, douleurs osseuses, oedeme cérébral autour de tumeurs et autres symptomes	

Tableau 1.4 : Exemples de maladies dépendantes de l'angiogenèse, 1 (Noonan *et al*, 2013) 2 (Howangyin & Silvestre, 2014); 3 (Zhao *et al*, 2013); 4 (Cheng *et al*, 2013); 5 (Edwards *et al*, 2013); 6 (Pousa *et al*, 2008); 7 (Weidemann *et al*, 2013) (Adapté de (Folkman, 2007).)

On peut résumer les effets de ces maladies en deux familles principales. La première famille implique une angiogenèse insuffisante ce qui entraîne des conséquences délétères sur la réparation tissulaire et la cicatrisation, pouvant entraîner une perte de fonction totale ou partielle de l'organe touché. Les CSM ont pu être utilisées dans des cas d'ischémie, ou du diabète notamment avec une certaine efficacité (Lu *et al*, 2011), mais aussi dans le traitement expérimental de la maladie de Crohn (Deng *et al*, 2011).

La seconde famille implique une angiogenèse augmentée et dérégulée entraînant une augmentation de l'inflammation locale, une augmentation des micros vaisseaux et des possibilités de saignements de différentes intensités. Cette deuxième famille est la plus complexe à traiter et n'est pas sans ressembler aux complications de type pro-angiogénique résultant de la présence de tumeurs cancéreuses. De nombreuses études mentionnent plusieurs approches pour le traitement de ces manifestations pro-angiogéniques en utilisant des traitements bloquant les voies d'initiation de l'angiogenèse via anti-VEGF par exemple (Weidemann *et al*, 2013). Enfin, l'étude de ces pathologies permet d'élucider les mécanismes

d'angiogenèse d'une façon inédite. En identifiant les joueurs impliqués à différents niveaux : cellulaire (Ribatti *et al*, 2011), de la MEC et de ses modifications via les métalloprotéases (Fingleton, 2007), des interactions cellule-matrice ainsi que des mécanismes moléculaires cellulaires ou paracrins (Adams & Alitalo, 2007). Bien sûr, un des champs d'études les plus développés implique l'étude de l'angiogenèse tumorale et les nouvelles possibilités de traitement anticancéreux que cela implique.

1.3.2.1. Angiogenèse tumorale

L'un des aspects les plus dommageables des tumeurs cancéreuses est d'utiliser et détourner les fonctions normales de l'organisme à leur propre profit. Elles génèrent des aberrations physiologiques en proliférant de manière anarchique et la variété de leurs manifestations rend le traitement des différents cancers extrêmement varié et parfois très complexe. Folkman a été un des premiers à suggérer un mécanisme cohérent de développement des tumeurs cancéreuses impliquant la promotion de l'angiogenèse pour soutenir la croissance tumorale (Folkman *et al*, 1971). Les mécanismes de l'angiogenèse tumorale impliquent un détournement de la physiologie normale de l'organisme non seulement pour assurer une survie des cellules tumorales qui ne pourraient soutenir une hypoxie prolongée, mais aussi pour assurer leur diffusion dans l'organisme via la circulation sanguine ou le système lymphatique conduisant à la formation de métastases (figure 1.8).

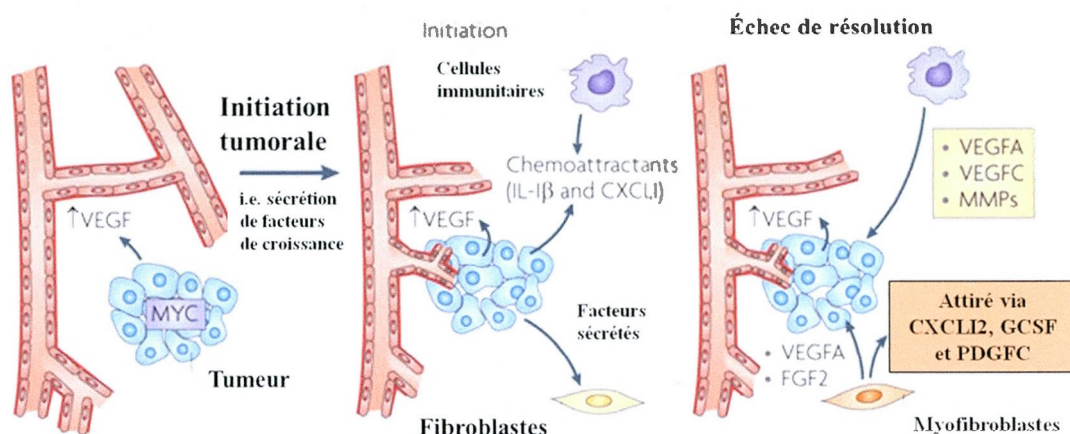


Figure 1.8 : *Angiogenèse tumorale* : Mécanisme de formation de nouveaux vaisseaux sanguins suite à la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales. (Adapté de (Chung *et al.*, 2010).)

Sous conditions pathologiques, suite à la différenciation oncogénique d'une cellule par l'activation d'un oncogène de type MYC par exemple, les cellules qui prolifèrent alors entrent en stress hypoxique et sécrètent du VEGF ce qui permet l'initiation de la cascade angiogénique. Les cellules cancéreuses sécrètent aussi d'autres facteurs solubles responsables de l'activation des cellules de type stromal les entourant, ainsi que de l'attraction de cellules du système immunitaire (Papetti & Herman, 2002). Les cellules stromales de support sont alors capables de soutenir le processus angiogénique par la sécrétion de facteurs favorisant la croissance vasculaire et l'inflammation. Ceci permet à la tumeur d'éviter le retour à l'état physiologique normal (la résolution) de la cascade angiogénique et donc d'obtenir la pérennité de la vasculogénèse et de l'inflammation. La tumeur continue alors sa croissance au-delà du mécanisme physiologique de « sauvetage » et de guérison des tissus. Dans ce contexte, les cellules stromales peuvent avoir un effet protumoral (voir chapitre précédent) en participant activement à la survie et au soutien de la croissance des tumeurs. L'angiogenèse n'est qu'un aspect du support que les CSM peuvent offrir, leur mécanisme de fonctionnement

implique aussi une capacité d'interaction avec la MEC leur permettant de modeler l'espace selon les besoins.

1.3.2.2. Le modelage de la matrice extracellulaire lors de l'angiogenèse

La matrice extracellulaire (MEC) est constituée de diverses structures qui sont spécifiques de l'organe ou du tissu où elle se trouve. La MEC fournit une architecture histologique et offre aux cellules de l'information biologique, un support mécanique et une structure pour l'adhésion et la migration. L'un des aspects essentiels de la MEC est sa capacité à initier des changements dynamiques dans sa composition moléculaire et dans sa capacité à se remodeler afin de promouvoir certains changements biologiques. Les composants de la MEC peuvent varier d'un tissu à l'autre, mais le collagène en constitue l'élément de base. Lors du processus d'angiogenèse, des mécanismes de remodelage de la MEC entrent en jeu et impliquent aussi en particulier la fibronectine et la laminine (Kostourou & Papalazarou, 2014). Afin de permettre une mobilité cellulaire suite à un phénomène de migration (angiogenèse, inflammation), ses composants doivent être dégradés à la suite d'une cascade enzymatique importante impliquant de nombreuses protéases en particulier les MMP (Yoon *et al*, 2003).

L'une des MMP les plus intéressantes dans un contexte d'angiogenèse supportée par les CSM est la MT1-MMP dont l'expression est directement reliée à la capacité des CSMh à migrer en réduisant le collagène de type I. La MT1-MMP est aussi requise dans l'intravasation *in vivo* des CSMh (Lu *et al*, 2010). Il s'agit donc d'une MMP ayant un mécanisme d'action multiple, elle aide au modelage de la MEC, mais aussi participe au clivage d'une molécule d'adhésion essentielle qu'est le CD44 (récepteur de l'acide hyaluronique) fortement exprimé sur les CSM, les libérant ainsi de leur ancrage tissulaire et leur permettant de migrer (Mori *et al*, 2002; Cichy & Puré, 2003). Toutefois, l'interaction entre ces différents facteurs lors de l'angiogenèse normale est peu décrite alors qu'une abondante littérature existe lorsque ces cellules sont impliquées en favorisant les interactions MEC/MT1-MMP/CD44 lors de l'angiogenèse tumorale (Negi *et al*, 2012).

1.3.2.3. Le rôle de MT1-MMP

La MT1-MMP est une protéine membranaire de 60kDa comprenant une portion transmembranaire ainsi qu'une portion extracellulaire abritant le site actif et enfin, d'une portion intracellulaire effectuant la transduction des signaux cellulaires (Gingras et al, 2001). Le site actif de la MT1-MMP est directement impliqué dans les interactions avec le MEC. En effet il clive différentes MMP solubles, agissant préférentiellement sur le Pro MMP2. Cette dernière une fois sous sa forme active peut alors dégrader plusieurs protéines de la MEC (Annabi et al, 2001). D'autre part, les fonctions de transductions du signal de la partie cytosolique de MT1-MMP sont localisées préférentiellement dans les cavéoles intracellulaires et sont directement impliquées dans les mécanismes de migration cellulaire (Annabi et al, 2001).

Dans certains modèles animaux *in vitro*, la surexpression de MT1-MMP augmente la formation de tubulures sur Matrigel (Hotary et al, 2000). En parallèle la stimulation de cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, FGF-2 et TNF α induit l'augmentation d'expression de MT1-MMP ayant pour conséquence une augmentation de la tubulogénèse sur Matrigel (Lafleur et al, 2002). De plus la coopération avec la Sphingosine-1 phosphate (S1P) est essentielle aux phénomènes de migration cellulaire (Langlois et al, 2005). Ces mécanismes opèrent via la transactivation du récepteur EGF (Langlois et al, 2007).

MT1-MMP a aussi été clairement impliquée dans les phénomènes d'invasion tumorale. Il permet de favoriser le clivage du CD44, qui est une molécule d'adhésion et favorise la migration des cellules tumorales et les phénomènes métastatiques. La migration de cellules de glioblastomes peut d'ailleurs être inhibée en présence de cathéchine du thé vert, l'EGCg en bloquant la voie RhoA/ROK inhibant ainsi mécanisme de clivage du CD44 médié par MT1-MMP (Annabi *et al*, 2005). Le blocage de l'interaction MT1-MMP/CD44 présente une cible d'intervention dans les thérapies anti-cancéreuses (Negi *et al*, 2012).

1.3.2.4. Le CD44

Le CD44 est une glycoprotéine transmembranaire pouvant se présenter sous plusieurs isoformes. La partie cytoplasmique de la molécule sert de récepteur à l'acide hyaluronique (AH) et la partie cytoplasmique convoie des informations de signalisation. Le CD44 est impliqué dans de nombreux mécanismes cellulaires incluant la régulation de la croissance cellulaire, de la survie, de la différenciation, de la motilité, de l'adhésion et de l'interaction avec la MEC (Ponta *et al*, 2003). Le dysfonctionnement ou l'altération de l'expression du CD44 contribue à de nombreuses pathologies en particulier lors du développement de certains cancers (Nikitovic *et al*, 2013), ajoutant parfois un facteur aggravant du fait de la participation des CSMh (Spaeth *et al*, 2013).

Le CD44 et ses isoformes sont présents à la surface d'une grande variété de cellules chez les vertébrés. Elle est encodée par un seul gène hautement conservé indiquant l'importance fonctionnelle de cette glycoprotéine. La présence de différentes isoformes du CD44 s'explique par des modifications post-traductionnelles et sont différentes en fonction du type cellulaire et des conditions de croissance. De plus, les transcrits subissent un épissage alternatif qui affecte principalement la portion extracellulaire proche de la portion transmembranaire. (Ponta *et al*, 2003).

Le CD44 possède des fonctions essentielles et leur absence ou leur dysfonction cause des phénotypes pathogéniques. Les processus connus pour être CD44-dépendants incluent le développement des organes, le guidage de l'axone neuronal, de nombreuses fonctions immunitaires et l'hématopoïèse (Ponta *et al*, 2003). La portion N-terminale non variable du domaine extracellulaire présente une affinité de fixation avec plusieurs composants de la MEC. Le site d'ancrage du AH est le seul à avoir été cartographié spécifiquement (Slevin *et al*, 2007). *In vitro*, les interactions avec les composants suivants ont été démontrées : hyaluronan, collagène, laminine, et fibronectine, ces interactions étant impliquées dans les phénomènes de migration cellulaire matrice-dépendante (Ponta *et al*, 2003). De nombreuses études ont montré que la capacité de lien avec le AH de la MEC a un impact direct sur la fonction du CD44. L'AH est un polysaccharide extracellulaire linéaire et hydrophile (figure

1.9). Il peut se présenter sous une forme de haut poids moléculaire ou de bas poids moléculaire. La réponse du CD44 peut varier en fonction du poids moléculaire du ligand AH. Le lien AH de haut poids moléculaire a été relié à une plus grande agressivité des cellules tumorales exprimant ce CD44 (Orian-Rousseau, 2010). En revanche, l'interaction du CD44 avec de l'AH de bas poids moléculaire semble générer une réponse de type angiogénique chez les cellules concernées (West *et al*, 1985).

Du fait de son interaction avec la MEC, le CD44 tient un rôle important dans les phénomènes d'ancrage. Sur les cellules de type CSM, le CD44 est exprimé à la surface de manière polarisée lorsque dans une structure tissulaire (Shimonaka *et al*, 2003). Lors de la migration de la cellule, le CD44 et autres molécules d'ancrage doivent être clivées via les MT1-MMP pour permettre la motilité ou mobilité de la cellule. Enfin, la fonctionnalité des CSM comme régulatrices de l'angiogenèse est clairement identifiée dans des contextes physiologiques ou pathologiques toutefois la régulation de leur contribution n'est pas encore clairement identifiée.

Structure chimique de l'acide hyaluronique

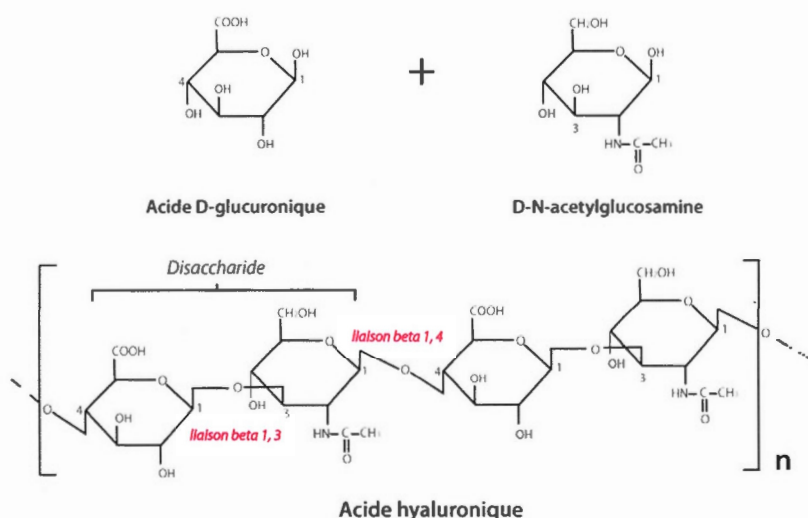


Figure 1.9 : *Structure chimique de l'acide hyaluronique* (Adapté du site internet http://biologiedelapeau.fr/spip.php?page=forum&id_article=62&lang=fr)

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

Les cellules stromales de la moelle osseuse ou cellules souches mésenchymateuses ont été largement étudiées dans notre laboratoire en particulier les cellules murines. Nous avons pu identifier un certain nombre de propriétés *in vitro* et *in vivo* (Annabi *et al*, 2004, 2003a; Eliopoulos *et al*, 2003; Al-Khaldi *et al*, 2003b). Une des particularités les plus intéressantes dans le cadre de nos projets était la capacité proantigénique des cellules et notamment la capacité à former des structures de type capillaire sur Matrigel et de se différencier en cellules endothéliales *in vivo*.

Toutefois, avant d'envisager l'utilisation de leur équivalent humain dans le cadre de projets de recherche clinique, il convenait de valider si les propriétés observées chez la souris pouvaient être reproduites dans des modèles humains. En effet, de nombreuses indications dans la littérature semblaient montrer que la corrélation entre les études sur modèles murins et les études sur modèles humains n'était pas complète.

L'objectif de notre étude était donc de caractériser les cellules CSMh *in vitro* et de valider leurs propriétés proantigéniques *in vitro* et *in vivo* ainsi que d'obtenir des éléments de réponse quant aux mécanismes impliqués dans l'apparition de ces phénomènes.

CHAPITRE III

MATERIEL ET METHODES

3.1 Isolation, culture et caractérisation des cellules

3.1.1 Isolation et culture des CSMh

Les cellules humaines utilisées dans cette étude sont issues de la moelle osseuse de la crête iliaque de patients ayant subi une chirurgie de la hanche. Chaque patient a signé un formulaire de consentement dans le cadre d'une étude du Dr John Antoniou titré : « ingénierie tissulaire des tissus du disque intervertébral en utilisant de cellules souches mésenchymateuses ». Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de l'hôpital général juif. Les échantillons ont été obtenus de manière anonyme dans le cadre d'une collaboration comme mentionné dans le paragraphe 8 de l'accord. Sont seulement disponibles les informations sur le sexe et l'âge des patients. Des prélèvements de 10-20 ml sont effectués au niveau de la crête iliaque. Les cellules mononuclées sont ensuite isolées via un gradient de densité FicollHypaque (GE heathsciences) et resuspendues dans un milieu de culture complet α MEM 20% de sérum de veau fœtal décomplémenté, 100 unités/ml de pénicilline/streptomycine, 2 mM de L-glutamine (Wisent technologies). Toutes les cellules sontensemencées avec 25 ml de milieu dans des flasques de culture de 175 cm² (Falcon) et incubées à 37°C avec une atmosphère humidifiée à 5% CO₂. Après 24h, les cellules non adhérentes sont jetées, et les cellules adhérentes sont soigneusement lavées deux fois au PBS. Les cellules sont incubées à 37°C 5 à 7 jours et décollées par une solution de Trypsin 0,25% et EDTA 1 mM. Les cellules sont ensuite réensemencées à une densité d'environ 2000 cellules /cm² (Passage 1). Après 14 jours, les cellules du passage 1 sont décollées par la solution de Trypsine/EDTA, elles seront aliquotées à une densité de 1-2 x 10⁶ cellules/ml dans du DMSO /30% FBS et congelées dans de l'azote liquide.

Pour étendre la culture, une ampoule de CSMh est décongelée et les cellulesensemencées à 5000 cellules/cm² et cultivée pendant 5-7 jours. Les cellules sont alors décollées, resuspendues dans du PBS contenant du bleu trypan afin d'effectuer un compte sur hématocytomètre et évaluer la mortalité. Les cellules sont alors réensemencées à la densité

initiale de 2000 cellules/cm² pour permettre l'expansion de la lignée. Chaque cycle de réensemencement est considéré comme un passage (congélation incluse) et est monitoré au cours des expériences de ce mémoire. Les cellules en surplus sont régulièrement congelées selon les conditions mentionnées plus haut. Des cellules sont ensemencées à faible densité en plaque 6 puits (Falcon) et 2 puits sont trypsinisés chaque jour afin de faire un comptage en triplicata de chaque puits avec la technique du bleu trypan. Les nombres obtenus permettent d'évaluer le temps de doublement et le profil de croissance des CSMh. Les CSMh répondent à trois principaux critères de sélection décrits par l'équipe de Dominici en 2006 (Dominici *et al*, 2006).

- 1) Les CSMh peuvent se différencier en ostéoblastes, adipocytes ou chondroblastes *in vitro*.
- 2) Les CSMh expriment à leur surface les biomarqueurs suivants : CD105, CD73 et CD90; et elles ne doivent en aucun cas présenter les biomarqueurs suivants : CD45, CD34, CD14, CD19 et HLA-DR.
- 3) Finalement, les CSMh adhèrent au plastique quand elles sont maintenues en cultures sous des conditions standards

3.1.2. Différenciation en ostéoblastes et adipocytes

La différenciation en ostéoblastes et adipocytes est effectuée telle que décrite dans la littérature (Eliopoulos *et al*, 2005). Pour induire la différenciation ostéogénique, les cellules à environ 70% de confluence sont cultivées en milieu complet supplémenté avec du β -glycérol phosphate (10mM), dexaméthasone (10^{-8} M) et de l'acide ascorbique 2-phosphate (5 μ g/ml) (sigma-Aldrich) pour 4 semaines, en changeant le milieu tous les 2-3 jours. Pour le marquage des cellules différenciées, l'alizarine Red S est utilisée pour marquer le calcium dans la MEC minéralisée. Les cellules adhérentes sont rincées avec du PBS, puis exposées à une préparation 2% d'Alizarine Red S (pH 4,1 ajusté avec de l'hydroxyde d'ammonium) pour 5 minutes, puis rincées à l'eau distillée. Pour induire la différenciation adipogénique, les cellules à environ 50-60% de confluences, sont cultivées en milieu complet supplémenté avec de l'indométacine (46 μ M), 3-isobutyl-methylxanthine (0,5 mM) dexaméthasone (1 μ M) et

insuline (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) pour 7 jours, en changeant le milieu deux fois durant cette période. Oil Red O (Sigma-Aldrich) a été utilisé pour le marquage des gouttelettes de lipides. Les cellules différenciées sont fixées avec du paraformaldéhyde (4% dans du PBS) à température pièce pour 1h et exposées à une préparation de Oil Red O à température pièce pour 10 minutes. Les cellules sont ensuite rincées avec de l'eau distillée. Les cellules sont prises en photo via un microscope Axiovert25 et un appareil photo Conz 167MT armé de pellicules de 400ISO.

3.1.3. Phénotypage par cytométrie de flux

Cette technique a été utilisée pour évaluer la présence ou l'absence des biomarqueurs spécifiques aux CSMh. Pour ce faire, les cellules isolées de la moelle osseuse, au passage 3 sont trypsinisées et marquées avec les anticorps monoclonaux anti humains suivants : CD90 (Thy-1 clone 5E10), CD73 (clone AD2), CD31 (marqueur endothélial clone WM59) en PE; CD44 (clone G44-26), CD45 (marqueur hématopoïétique clone HI30), CD34 (marqueur des cellules souches clone 581) obtenus de BD Biosciences, et le CD105 (endoglin clone SN6) en FITC de Serotec. Comme contrôles négatifs, nous avons utilisé les isotypes appropriés à chaque anticorps, issus de la même compagnie et de la même couleur. Les cellules ont été analysées sur un FACS Calibur équipé d'un laser bleu (488nm) et trois filtres (FL1 BP530/30, FL2 BP 585/42 FL3 670LP) et d'un laser rouge (635nm) avec un filtre (FL4 BP661/16) à l'aide du logiciel Cellquest Pro (BD Biosciences) ou du logiciel Kaluza 1.2 (Beckman Coulter). Toutes les expériences subséquentes de cytométrie se font sur le même appareil et avec les mêmes logiciels d'analyse.

3.1.4 Tests d'adhésion

Dans des plaques 96 puits à fond rond sont appliqués, en triplicatas, 100 µl des composés suivants : collagène de type I issu de tendon de queue de rat (Silver & Trelstad, 1980) à 10 µg/ml, fibrine 0,35% poids-volume dans du NaOH 1N, Fibronectine à 10 µg/ml (Roche), Vitronectine à 10 µg/ml (Yatohgo *et al*, 1988), Caséine 0,25% poids/volume dans du PBS

1X, Acide hyaluronique (HA) 1mg/ml, lamine 1 à 10 µg/ml (SIGMA), élastine 10 µg/ml, BSA 0,5% (SIGMA). La plaque est placée pour la nuit à 4°C. Le lendemain, le surplus de liquide dans les puits est éliminé délicatement afin de ne pas altérer le revêtement du puits, s'en suit un lavage au PBS 1x et enfin un blocage au BSA 0,5% pour 45 min à 37°C. Cent mille cellules CSMh sont ensuiteensemencées et incubées pendant 2h à 37°C. Le surnageant est ensuite aspiré, les cellules fixées au formaldéhyde 4%, puis marquées au cristal violet et lavées. Enfin, les puits sont lysés par une solution de SDS 0,1% et la plaque est analysée par un densitomètre de Molecular Devices. La lecture se fait à une longueur d'onde de 595 nm. Pour le calcul des résultats, la moyenne de la DO des puits vides est soustraite à la moyenne des résultats selon les conditions.

3.1.5 Tests de migration et quantification par analyse d'image

Le test de migration se fait dans une chambre de migration de Boyden modifiée, sur plaque 24 puits (1 chambre par condition). Le dessous du filtre chémotactique (Costar) est recouvert de 100 µl de gélatine et placé à 4°C la nuit en trempant dans du PBS pour éviter le séchage. Le lendemain, le PBS est jeté et 600 µl des milieux suivants sont pipetés dans chaque puits : VEGF 50 ng/ml, S1P à 10 µM et bFGF 300 ng/ml. Cent mille cellules CSMh sont placées dans la partie supérieure de la chambre de Boyden et la migration se fait pendant la nuit. Le lendemain les filtres sont fixés au formaldéhyde 4% et marqués au cristal violet. Les filtres sont photographiés pour évaluer le nombre de cellules sur le filtre et analysés avec le logiciel d'analyse MetaXpress (Molecular Devices). La logique d'analyse est la suivante : une séparation de couleur est appliquée à l'image, la verte est gardée car elle donne la meilleure résolution, les trous du filtre sont ôtés par un filtre de taille. Pour chaque échantillon, une fenêtre de 500x300 pixels est analysée en échelle de gris arithmétique sur 16-bit, filtrée pour les petits éléments non significatifs de 3x3 pixels. Ensuite, un filtre de morphologie par inversion de l'image est appliqué, le module « *angiogenesis tube formation* » ainsi que l'algorithme « *skelotonization* » 10-50 produisent le résultat le plus proche de l'évaluation *de visu*. Chaque image est analysée selon le même processus et les résultats numériques de surface occupée sont compilés et analysés dans Excel.

3.2 Évaluation du potentiel pro-angiogénique des CSMh *in vivo*

3.2.1 Évaluation de la spécificité des anticorps dans un modèle de xénogreffe : tests d'immunoréactivité croisée

Lorsque des modèles de xénogreffe sont utilisés, il est important de vérifier que les anticorps que nous allons utiliser pour la cytométrie de flux sont spécifiques de l'espèce étudiée. Il faut donc tester les anticorps de spécificité murine sur les CSMh afin de vérifier l'absence de réaction croisée. Tous les anticorps de spécificité murine ont été testés et ne présentent aucun marquage sur les cellules humaines, lorsque comparés au contrôle isotypique adéquat. De la même manière, il faut valider les anticorps de spécificité humaine que nous souhaitons utiliser pour tracer les cellules humaines *in vivo* chez les souris NOD SCID afin de s'assurer de l'absence de réaction croisée. Ce test a été effectué sur des cellules issues de différents organes de la souris en particulier du poumon qui contient de nombreuses cellules endothéliales. Nous n'avons détecté aucun marquage des anticorps de spécificité humaine sur les différents types de cellules murines (Données non montrées).

3.2.2 Injection et isolation des implants de Matrigel

Pour éviter le rejet des xénogreffes, nous avons travaillé avec des souris NOD-SCID qui ont la particularité d'être immunodéficientes. Deux millions de CSMh, préalablement lavées au PBS 1X pour enlever toute trace de sérum, sont mélangées à 500 μ l de Matrigel (BD Biosciences) encore sous forme liquide. Le mélange est injecté par voie sous-cutanée dans le flanc gauche des souris NOD SCID. Les implants sont laissés en place pour différents temps (entre 7 et 21 jours) selon le type d'expérience. Les animaux sont sacrifiés par inhalation de CO₂. L'implant est photographié sur la partie sous-cutanée à la suite d'une section ventrale de la peau de la souris. Les implants sont ensuite retirés par chirurgie. Ils sont pesés, coupés en deux. Une moitié sera utilisée pour des analyses en histologie et l'autre moitié sera utilisée pour récupérer les cellules infiltrées dans l'implant et analysées par cytométrie en flux. Les implants conservés pour l'histologie sont mis en présence d'OCT (Life Technologies),

congelés dans de l'azote liquide et conservés jusqu'à la coupe et le marquage Hématoxyline/Éosine. Les implants conservés pour la cytométrie sont immédiatement placés en milieu de digestion collagénase/ DNase (1,6 mg/ml, 200 μ g/ml) (Sigma) dans du DMEM (Wisent) sans sérum, coupés en petits morceaux et placés dans un incubateur 37°C. L'implant est resuspendu par aller-retour de pipette (P1000) jusqu'à complète homogénéisation des cellules.

3.2.3 Caractérisation par cytométrie de flux et histologie

Les cellules obtenues dans les moitiés d'implants suite à la digestion collagénase/DNase sont marquées par des anticorps appropriés afin de discriminer par cytométrie de flux les cellules d'origine murine ou d'origine humaine. Les anticorps de spécificité murine testés sont le CD45 (clone 30-F11) en APC et CD31 (clone PECAM-1) en PE (BD Biosciences). Les anticorps testés pour la spécificité humaine sont ceux décrits en 3.1.4. L'autre moitié des implants qui a été congelé est coupé au cryostat et marqué sur lame selon la méthode Hématoxyline et Éosine (H&E), les sections traitées au xylène sont d'abord réhydratées, lavées puis marquées à l'éosine et ensuite déshydratées et enfin fixées au xylène. Les lamelles sont ensuite fixées sur les lames qui sont photographiées au microscope Axiovert25 de Zeiss.

3.3 Potentiel angiogénique in vitro des CSMh

3.3.1 Étude des formations de structure sur Matrigel

Les cellules sont isolées par trypsinisation et comptées. Les plaques sont recouvertes de Matrigel et laissées à solidifier à température ambiante. Les cellules sontensemencées à une densité de 6000 cellules/cm² de manière homogène sur la surface du Matrigel. En parallèle, des plaques sans Matrigel sontensemencées comme contrôle. Les plaques sont ensuite incubées à 37°C et 5% CO₂. La formation des structures se produit dans les premières 24h et la cinétique dépend de la densité d'ensemencement. Des photos sont prises à intervalle

régulier pour reconstituer la cinétique de manière visuelle. A différents temps, les cellules sont isolées du Matrigel via une digestion dans un milieu collagénase/DNAse selon les mêmes conditions que pour les implants sur souris. Elles sont comptées et utilisées en partie pour le marquage et l'analyse par Cytométrie de flux et l'autre partie des cellules est centrifugée et congelée en culot sec pour de futures extractions d'ARN. Le phénotypage par cytométrie de flux s'attarde aux marquages du CD44 du CD105 ou du CD31 avec les contrôles isotypiques appropriés.

3.3.2 Expression de MT1-MMP par RT-PCR

Les cellules isolées en culot sec lors des différentes expériences de formation de structure sur Matrigel sont utilisées pour faire une extraction d'ARN avec le kit RNeasy Mini (Qiagen) qui implique une stabilisation du culot avec RNAlater et un passage sur colonne de purification. L'ARN obtenu est quantifié par densité optique 260/280 nm. Les amorces utilisées pour l'amplification de MT1-MMP en sens 21mer ATC-GAT-ACA-GCT-CTC-TTC-TGG et anti-sens 20 mer GTC-AAG-ACT-TCA-TCG-CTG-CC pour un amplicon de attendu 187 pb. Les amorces ont été sélectionnées sur 2 exons séparés par 1 intron qui facilite la différenciation de l'ADN génomique en cas de contamination. Le contrôle de la réaction se fait avec les amorces 18s d'ARN ribosomal sens TTA-CCA-AAA-GTG-GCC-CAC-TA et anti-sens GAA-AGA-TGG-TGA-ACT-ATG-CC pour un produit attendu de 345 bp. La quantité de 200 ng d'ARN est déterminée comme étant optimale et les échantillons sont amplifiés avec comme contrôle positif de l'ARN de cellules endothéliales HMEC. Les échantillons sont mixés avec du magnésium 200µm de dNTP et 0,2 µM d'amorces. Le programme du thermocycleur (Biometra) comprend une étape de RT à 50°C pendant 30 min puis une dénaturation à 94°C pour 5 min et 30 cycles 94°C 30 sec, 55°C 1 min, 72°C 1 min et une dernière étape à 72°C pendant 10 min (Biometra). Les échantillons sont ensuite déposés sur gel d'agarose contenant 2% avec bromure d'éthidium et migrés avec une tension de 100V. Les gels obtenus sont ensuite photographiés sous table d'illumination UV.

CHAPITRE IV

RÉSULTATS

4.1 Les CSMh présentent les caractéristiques de cellules stromales humaines de la moelle osseuse

Les CSMh isolées au laboratoire sont issues de la moelle osseuse prélevée sur la crête iliaque du bassin de différents patients (figure 4.1A). Les CSMh obtenues offrent un profil de croissance cellulaire similaire (figure 4.1B) qui donne un temps de doublement moyen de 7 jours calculé sur la base de la formule de la courbe de régression : $y=0.0824e^{0.0992x}$. Enfin, chaque lot de cellules a été évalué pour sa capacité de différenciation en adipocyte ou en ostéocyte (figure 4.1C).

Pour chaque patient, les cellules ont été examinées par cytométrie en flux pour l'expression des marqueurs permettant de qualifier les CSMh (Figure 4.2). Comme attendu, les CSMh expriment les marqueurs CD90, CD73, CD44 et CD105, mais sont négatives pour les marqueurs CD45, CD34 et CD31. L'absence de CD45 signifie qu'elles ne sont pas de lignée hématopoïétique et donc qu'elles n'exprimeront pas le CD14 marqueur des monocytes/macrophages, le CD19 marqueur des cellules B/plasmocytes ni le HLA-DR marqueur du CMH de Type II présent sur les cellules présentatrices d'antigène, ces trois marqueurs étant par définition co-exprimés avec le CD45. L'absence de CD34 montre que la culture n'est pas contaminée par des cellules souches hématopoïétiques et enfin l'absence de CD31 montre la carence de cellules endothéliales dans la culture.

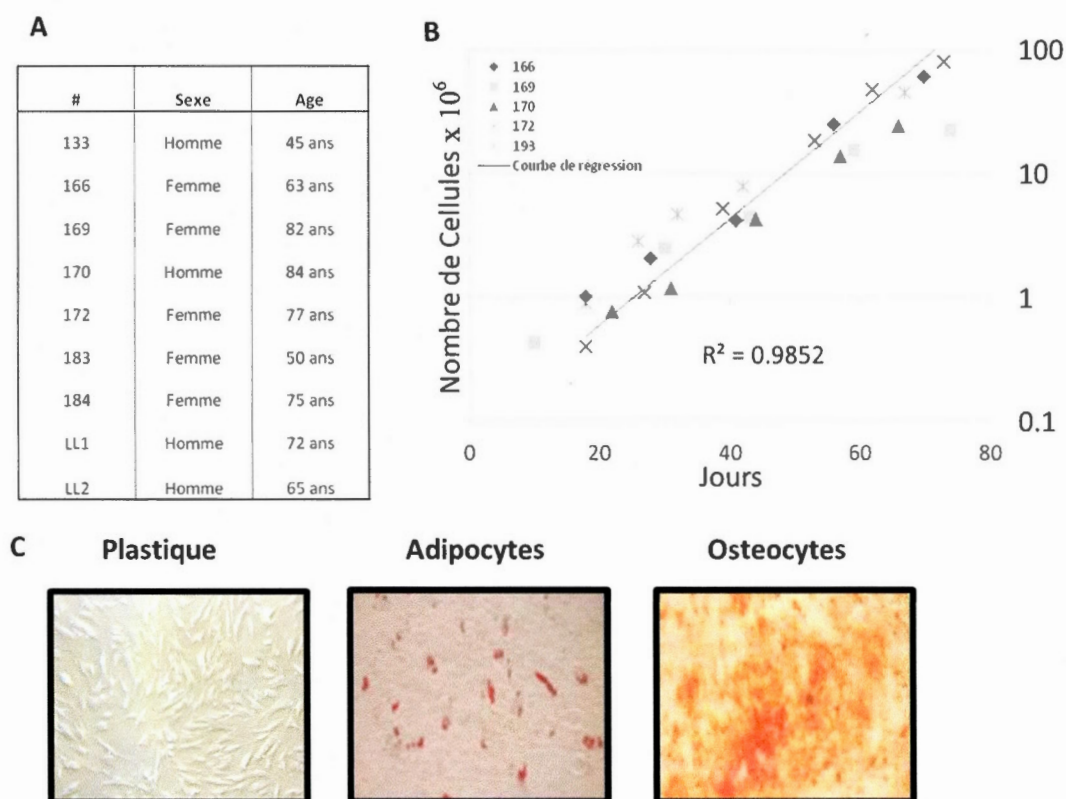


Figure 4.1 : Caractérisation des CSMh : Les cellules sont issues de la moelle osseuse de différents patients (A). Age et sexe des patients étudiés. (B) Courbe de régression du nombre de cellules des patients 166 ♦, 169 ■, 170 ▲, 172 ×, 193 x du nombre de jours de culture, (C) Morphologie des CSMh sur plastique, après différenciation dans le milieu « adipocytes » indométacine, 3-isobutyl-méthylxanthine, dexaméthasone et insuline pour 7 jours et marquées à en Oil Red O, dans le milieu « ostéocytes » b-glycérol, dexaméthasone et acide ascorbique 2-phosphate pour 4 semaines et marquées en alazarine Red S.

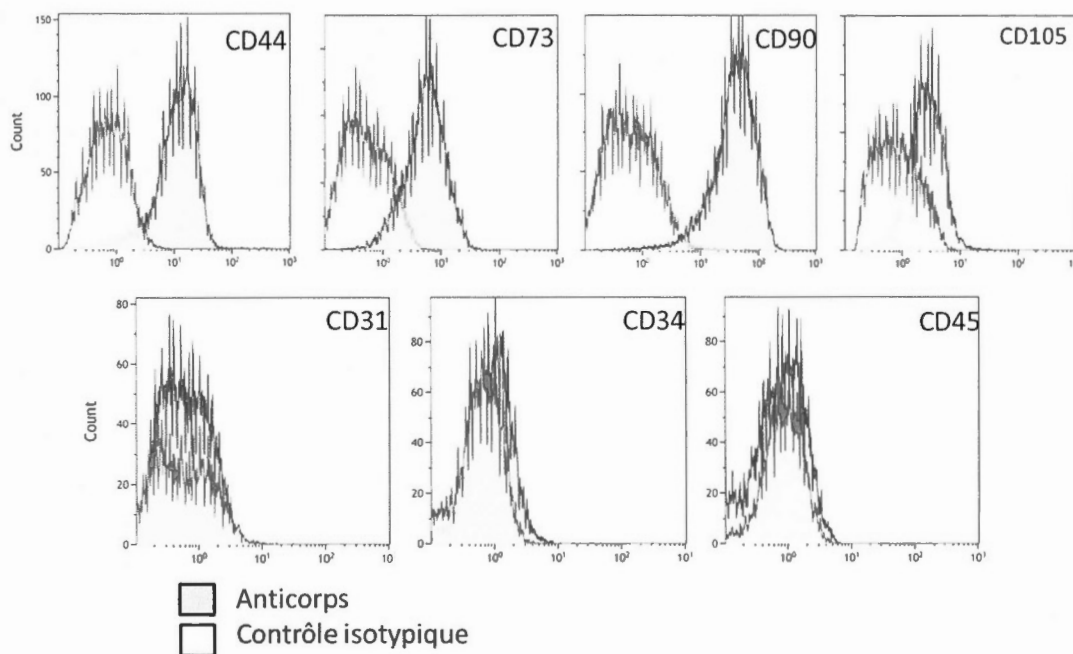


Figure 4.2 : Immunophénotypage des CSMh : Pour chacun des patients, le profil d'expression des CSMh est établi par cytométrie de flux. Les marqueurs CD44, CD73, CD90, CD105, CD31, CD34 et CD45 sont testés ■. Pour déterminer si le marquage est positif ou négatif chaque marqueur est superposé à son isotype contrôle correspondant.

4.2 Les propriétés d'adhésion et de migration des CSMh sont compatibles avec leurs propriétés pro-angiogéniques

Afin de déterminer les facteurs pouvant expliquer le potentiel angiogénique des CSMh *in vivo* nous avons voulu regarder d'abord leur comportement *in vitro*. Pour évaluer leur affinité avec différents composants de la MEC, nous avons effectué un test d'adhésion classique où le BSA constitue le contrôle négatif. Nous avons testé les CSMh de deux patients différents et à deux passages en triplicatas. Les CSMh étant déjà adhérentes sur plastique on constate une affinité avec l'ensemble des composés testés, toutefois l'adhérence est particulièrement

prononcée pour la fibronectine avec un facteur d'adhésion 5 fois supérieur et en second lieu pour le collagène et la vitronectine par un facteur 2 fois supérieur au contrôle BSA 0,5% (figure 4.3)

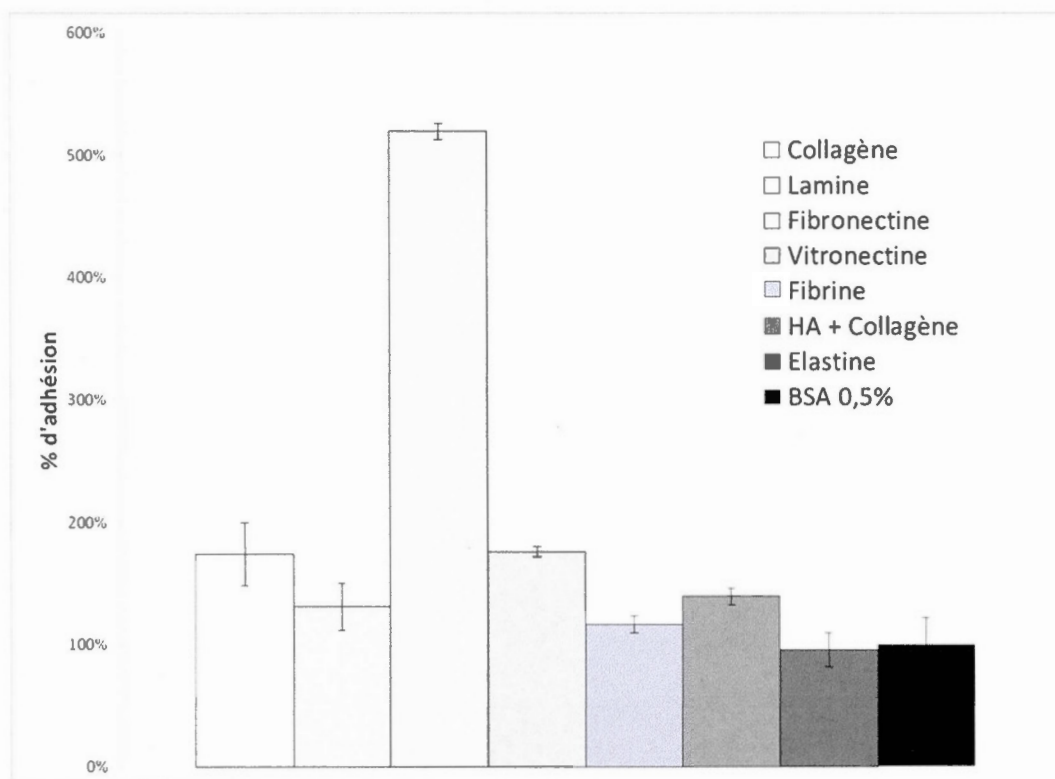


Figure 4.3 : *Propriétés d'adhésion des CSMh* : Cent mille cellules de CSMh sontensemencées dans des puits de plaque 96 puits pré-enduites avec les composés de la MEC suivants : collagène □, lamine □, fibronectine □, vitronectine □, fibrine □, HA+ collagène ■, élastine ■ et enfin BSA 0,5% ■ comme contrôle négatif. Test fait sur deux patients, deux passages différents, en triplicata. Résultat exprimé en pourcentage d'adhésion en référence au BSA 0.5%. Barres d'erreurs SD de la moyenne

La fibronectine joue un rôle majeur dans l'adhésion, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire. Elle est notamment impliquée dans la cicatrisation et dans l'embryogenèse (Halper & Kjaer, 2014). La fibronectine a de nombreuses fonctions. Son rôle est particulièrement crucial lors des phénomènes de cicatrisation cellulaire. Dans un premier temps, elle est déposée sous forme soluble lors de la formation du caillot sanguin, dans un deuxième temps les fibroblastes et les macrophages remodelent le tissu endommagé et contribuent à sa reconstitution. Les MSCs ont montré leur capacité à participer à la réparation tissulaire lorsqu'elles sont injectées sur site (Liu *et al*, 2006). Leur affinité avec la fibronectine constitue un avantage pour faciliter leur ancrage sur le site de cicatrisation dans la MEC particulièrement riche en fibronectine.

Une autre façon complémentaire de comprendre leur comportement *in vivo* est de déterminer quels sont les facteurs solubles qui peuvent initier la migration des cellules. Lors de notre expérience en chambre de Boyden modifiée, nous avons pu constater que les CSMs présentent un fort potentiel migratoire en présence de bFGF et de manière surprenante voient leur migration inhibée par la présence de S1P (figure 4.4) Le bFGF est membre de la famille des facteurs de croissance des fibroblastes. Dans le tissu normal, le bFGF est présent dans la membrane basale, mais surtout dans la MEC subendothéliale des vaisseaux sanguins. Il est fixé à la membrane tant qu'il n'y a pas de signalisation. Lorsque le bFGF est activé par des enzymes dégradant l'héparan-sulfate, il joue le rôle de médiateur dans l'initiation de l'angiogenèse. Chez la souris, le bFGF peut aussi protéger le cœur après un infarctus, réduisant la mort cellulaire et améliorant la fonction cardiaque (House *et al*, 2003).

Nos résultats suggèrent que les CSM pourraient être potentiellement recrutées sur le site d'un dommage tissulaire via l'activation du bFGF. D'autre part, lorsque les CSM sont injectées à des fins thérapeutiques, cette affinité pour le bFGF peut expliquer le « homing » des cellules sur le site d'un infarctus ou d'un dommage cellulaire.

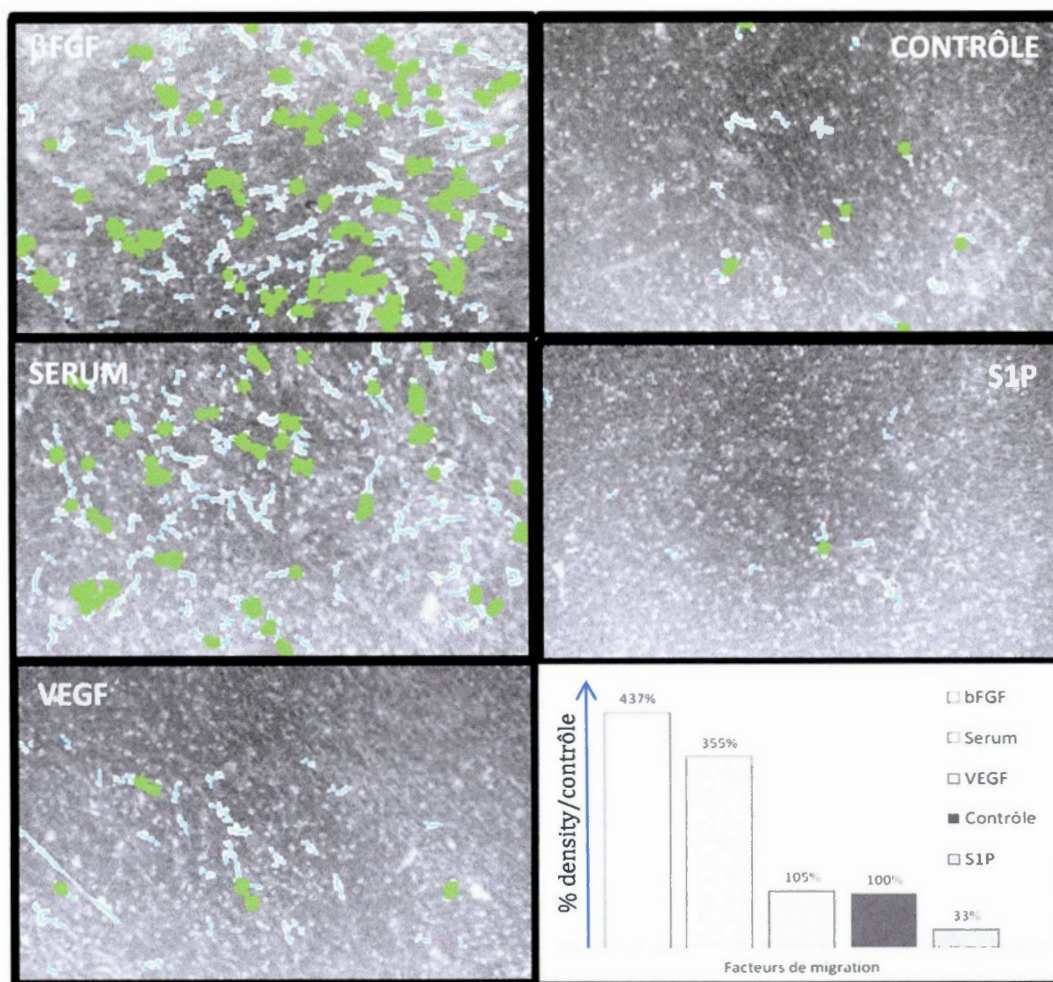


Figure 4.4 : *Facteurs de modulation de la migration des CSMh* : Expérience sur chambre de Boyden modifiée en plaque 24 puits. Les CSMh sontensemencées dans la partie supérieure de la chambre dont la partie inférieure est enduite de gélatine. Les chambres sont appliquées dans l'un des milieux suivants β FGF (300ng/ml), VEGF (50ng/ml), S1P (10 μ M), sérum et contrôle milieu seul. Après migration sur la nuit, les filtres sont fixés et marqués au cristal violet. Les images sont analysées à l'aide du logiciel MetaXpress. Les résultats sont exprimés en pourcentage de densité de cellule par rapport au contrôle.

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est une sphingolipide de signalisation ou médiateur lipidique bioactif. Il s'agit d'un médiateur lipidique sanguin, mais est aussi présent de manière moins abondante dans les fluides tissulaires. Ce gradient de concentration de la S1P semble avoir une signification importante dans le trafic des cellules du système immunitaire, plus particulièrement les cellules B et T (Chi, 2011). La S1P est aussi un régulateur des systèmes sanguins et vasculaires impliqués dans l'angiogenèse (Takuwa *et al*, 2010) et a été décrite comme stimulant la migration et les propriétés vasculogéniques des CSM murines *in vitro*. (Annabi *et al*, 2003b).

Toutefois, notre étude a été effectuée à une concentration de 10 μ M qui se situe dans la gamme des concentrations physiologiques (5-40 μ M), mais qui est dix fois supérieure aux concentrations habituellement utilisées dans les études murines (1 μ M). Les résultats indiquent un mécanisme différentiel de la S1P en fonction de sa concentration. Des indications en ce sens existent dans la littérature où une forte concentration de S1P en intratumoral inhibe la migration de fibroblastes normaux, mais stimule, en revanche, la migration des cellules épithéliales ou fibroblastiques cancéreuses (Wang *et al*, 2008). Ce comportement différent des CSM est cohérent avec le rôle du S1P dans l'organisme. Il est un médiateur de l'inflammation (Chi, 2011), mais aussi de l'intégrité membranaire de vaisseaux sanguins (Takuwa *et al*, 2010). Du fait de leur potentiel immunosuppresseur, les CSM ne sont pas attirées par un gradient de S1P fort afin de laisser la possibilité à la réponse immunitaire normale de se produire. En revanche, une concentration plus faible à la suite de la perte de l'intégrité d'un vaisseau sanguin (la S1P est sécrétée par les érythrocytes) attire les CSM qui peuvent alors contribuer à la réparation tissulaire. Pour accréditer une de ces thèses, il serait intéressant dans un premier temps de vérifier la viabilité des CSMh pour la concentration de S1P utilisée, pour ensuite expérimenter différentes concentrations de S1P et éventuellement visualiser un comportement différentiel des CSMh en fonction de la concentration.

4.3 Les CSMh montrent leur potentiel pro-angiogénique *in vivo* sans se différencier en cellules endothéliales.

Nous avons montré dans notre laboratoire que les CSMm implantées en Matrigel chez la souris ont le potentiel de promouvoir l'angiogenèse, mais se différencient aussi en cellules endothéliales (Al-Khalidi *et al*, 2003a). Dans le cas de CSMh implantées en Matrigel dans des souris NOD-SCID immunodéficientes, nous constatons une formation de vaisseaux à l'intérieur de l'implant (figure 4.5). Les coupes en H&E identifient clairement les capillaires sanguins générés, où les globules rouges sont aisément identifiables.

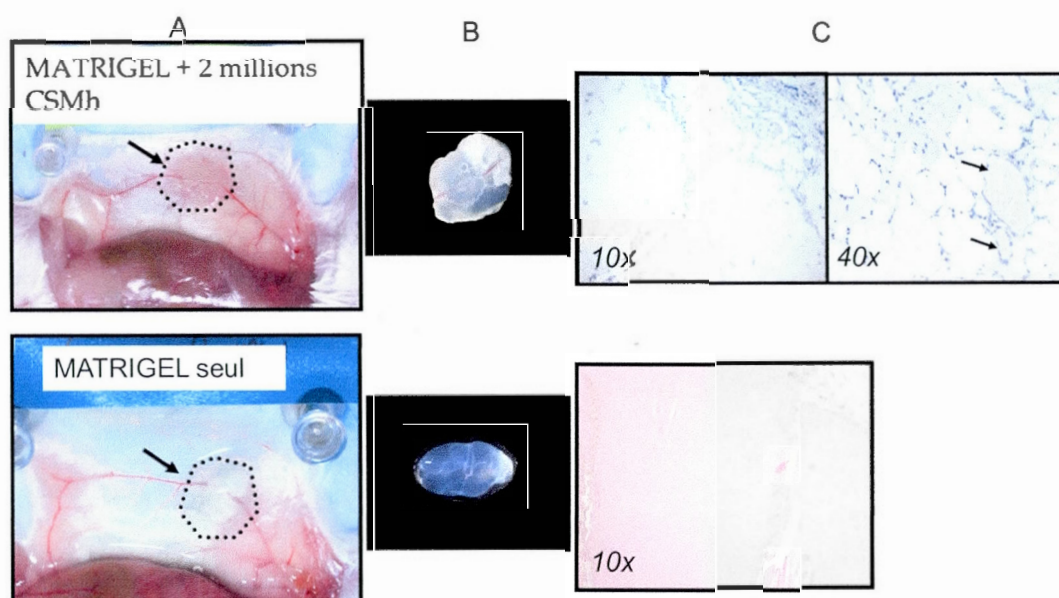


Figure 4.5 : Néo-vascularisation d'un implant de Matrigel : Deux semaines après injection des implants de Matrigel. (A) Photos des implants sur la peau de souris. (B) photos des implants complets après prélèvement. (C) Coupes H&E à différents grossissement 10x ou 40x. Les flèches soulignent la présence de cellules périvasculaires dans l'implant de Matrigel contenant les CSMh. (4 Expériences indépendantes, 2 souris par expérience)

L'implantation de Matrigel seul, qui est pourtant très riche en facteurs de croissance à potentiel pro-angiogénique (Hughes *et al*, 2010) ne suffit pas à produire une réponse pro-angiogénique. Les CSMh une fois implantées dans le Matrigel se trouvent en hypoxie ce qui

génère un stress important. Afin de survivre, les CSMh produisent de facteurs chemo-attractants dont le principal est le VEGF (Annabi *et al*, 2003a). L'analyse par cytométrie de flux des implants révèle un nombre important de CSMh toujours présentes, mais aussi nous constatons la présence de cellules d'origine murine (figure 4.6).

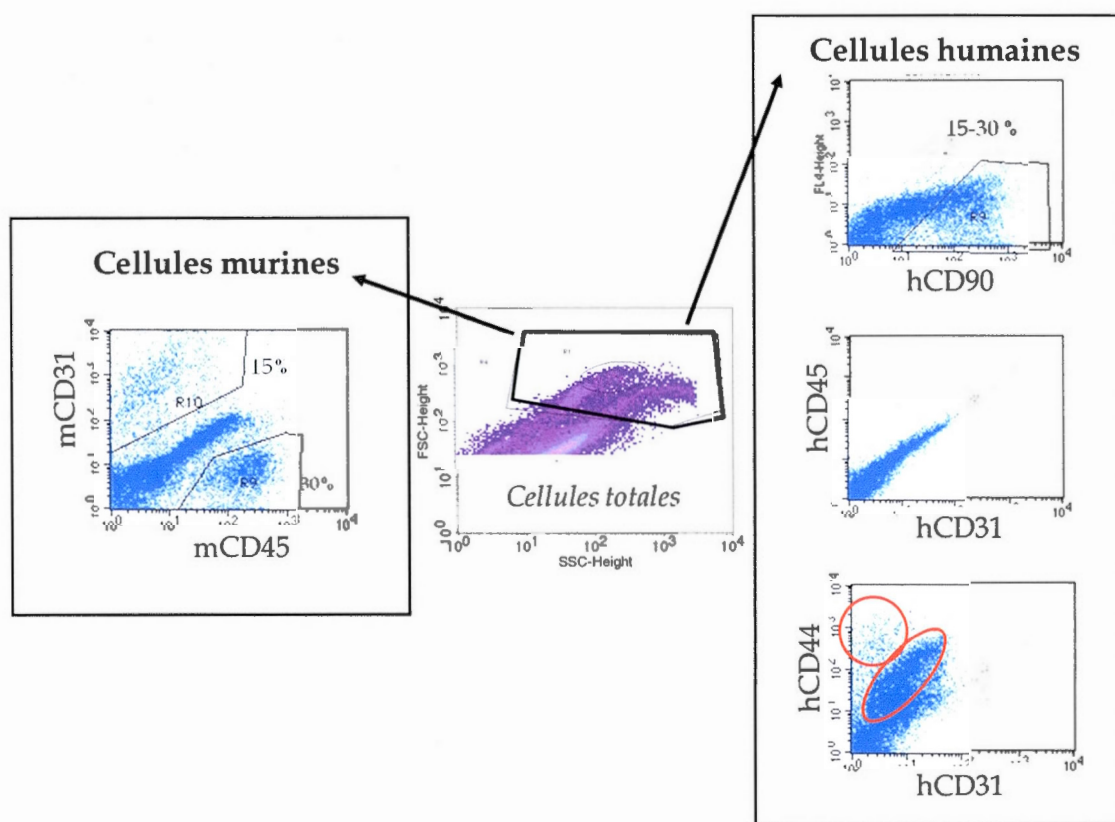


Figure 4.6 : Composition cellulaire des implants vascularisés : Analyse de la composition cellulaire des implants par cytométrie de flux J14 après l'implantation. Les cellules totales sont analysées. Le « dot plot » cellules murines identifie une proportion de 45 % de cellules murines dans l'implant, composé de 15% des cellules endothéliales (ensemble mCD31 +) et de 30% de cellules hématopoïétiques (ensemble mCD45+). Le « dot plot » cellules humaines indique une proportion de 15% à 30% de cellules hCD90 (ensemble hCD90+) ou hCD44

(ensemble hCD44+) mais présente une absence d'autres cellules d'origine humaine endothéliales (hCD31-), ou hématopoïétiques (hCD45-).

La moitié des cellules isolées est d'origine murine, 15% sont des cellules endothéliales mCD31 + / mCD45- qui composent certainement les capillaires de l'implant. 30% sont des cellules hématopoïétiques mCD45+ présentes dans le sang circulant dans l'implant et des cellules infiltrantes. Les contrôles isotypiques associés (tous marqueurs confondus) se confondent parfaitement avec les populations double négatives de chaque quadrant (données non montrées), ce qui a permis de positionner les fenêtres d'analyses des différentes populations avec précision. Entre 15% et 30% des cellules présentes dans l'implant sont d'origine humaine hCD90+. Les CSMh ne présentent pas de co-marquage avec les marqueurs murins, ce qui montre l'absence de fusion cellulaire. De plus, nous ne détectons aucun marquage hCD31 ni hCD45 ce qui montre clairement que les CSMh ne se différencient pas en cellules endothéliales dans ce contexte contrairement à leurs homologues murines. Dans ce contexte il est prudent de préciser qu'un minimum de 100 000 cellules ont été analysées pour chaque échantillon et que dans aucun cas nous n'identifions de cellules présentes dans les quadrants hCD31+ et hCD45+. Enfin, il faut noter l'apparition de deux populations distinctes en ce qui concerne l'expression du CD44 ce qui semble indiquer une certaine différenciation des CSMh probablement en péricytes (Klein *et al*, 2011). L'expérience a été répétée 4 fois avec 2 souris par expérience avec des résultats similaires. L'implantation avec des nombres inférieurs de cellules (1 Million) conduit aussi à la formation de structures, mais en 28 jours. L'implantation avec 4 millions de cellules pour un temps équivalent de 14 jours induit une plus forte vascularisation de l'implant (résultat non montré). Le potentiel angiogénique est donc dépendant directement du nombre de cellules implantées.

4.4 Les CSMh montrent leur potentiel pro-angiogénique *in vitro* en normoxie de manière MT1-MMP-indépendante

Lorsque les CSMh sontensemencées sur des plaques tapissées de Matrigel, elles forment facilement des tubulures en normoxie (figure 4.7) qui régressent après 24h. Seules les cellules

endothéliales étaient capables de former aussi des structures sur Matrigel. Cette interaction avec les composants de la MEC composant le Matrigel est unique à ces types cellulaires et montre une capacité morphogénique qui explique en partie leurs propriétés. Lorsqu'en revanche les CSMh sont mélangées dans du Matrigel (milieu hypoxique) et placées en culture selon les mêmes conditions, elles ne survivent pas plus de quelques heures. Contrairement à la situation *in vivo* elles ne peuvent recruter les cellules de l'hôte murin pour assurer leur survie.

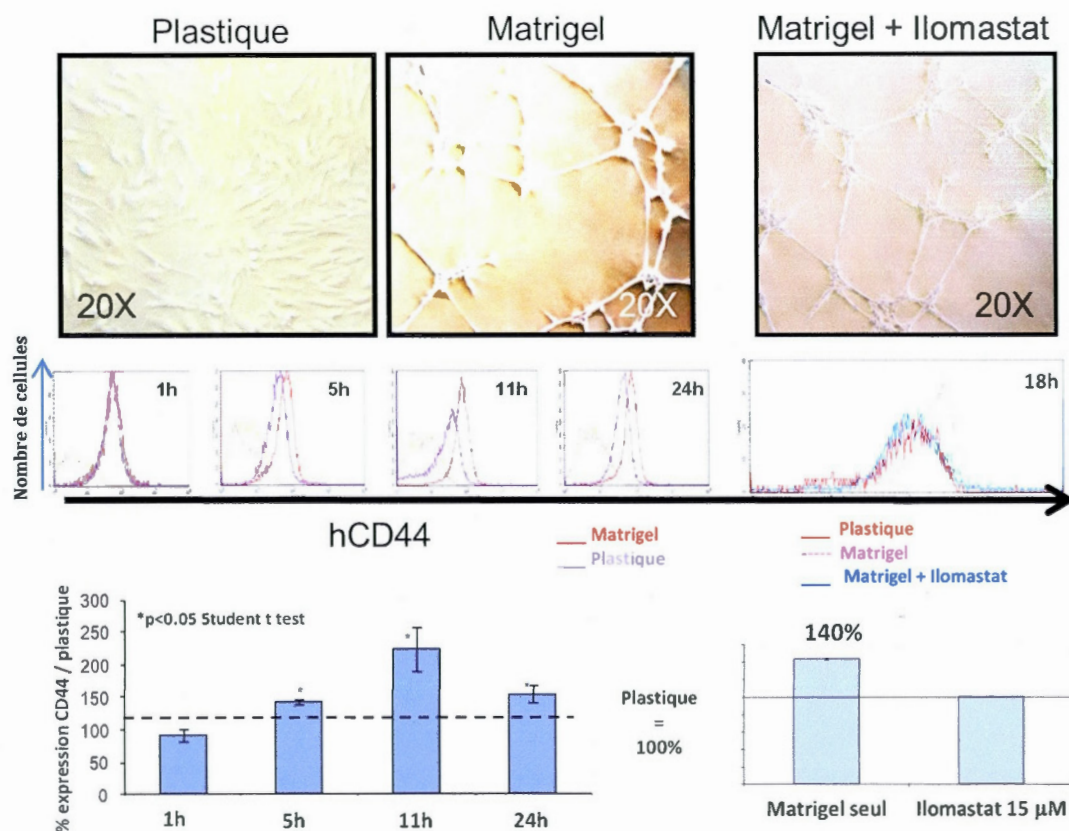


Figure 4.7 : Cinétique de la formation de structure sur Matrigel des CSMh : Partie supérieure : photo des cellules sur plastique (gauche), Matrigel (milieu), Matrigel+Ilomastat (droite) à un grossissement de 20x. Au milieu : Analyse par cytométrie de flux du niveau de

hCD44 sur plastique ou sur Matrigel à 1h, 5h, 11h ou 24h comparé aux contrôles isotypiques appropriés (gauche). Analyse du hCD44 à 18h en comparant plastique, Matrigel et Matrigel+Ilomastat (droite). En bas : Histogrammes comparant le % d'expression du CD44 par rapport au plastique, normalisé comme 100% d'expression.

L'expérience a été reproduite avec 4 patients différents en duplicata pour chaque condition. Ce résultat indique une forte implication du CD44 dans l'ancrage et la motilité des CSMh lors de la formation des structures tubulaires. La régulation du CD44 à la surface des cellules étant dépendant de la MT1-MMP (Cichy & Puré, 2003), nous avons soumis les CSMh à de l'Ilomastat (15µM) qui est un inhibiteur des MMP dont la MT1-MMP. Aucun effet n'a pu être observé sur la formation de structure indiquant un mécanisme MMP-indépendant. La même expérience a été effectuée avec un anticorps spécifique de la région catalytique du MT1-MMP sans effet encore sur la formation de structure (résultat non montré) indiquant un mécanisme MT1-MMP-indépendant.

Nous notons en revanche qu'en présence d'Ilomastat, le niveau d'expression du CD44 retourne à son niveau basal sans affecter les structures. Les CSMh poussant sur plastique et soumises à l'Ilomastat, selon les mêmes conditions, n'ont aucune altération du niveau d'expression du CD44. Enfin, nous avons observé l'expression de MT1-MMP par RT-PCR en comparaison de l'expression sur plastique (figure 4.9)

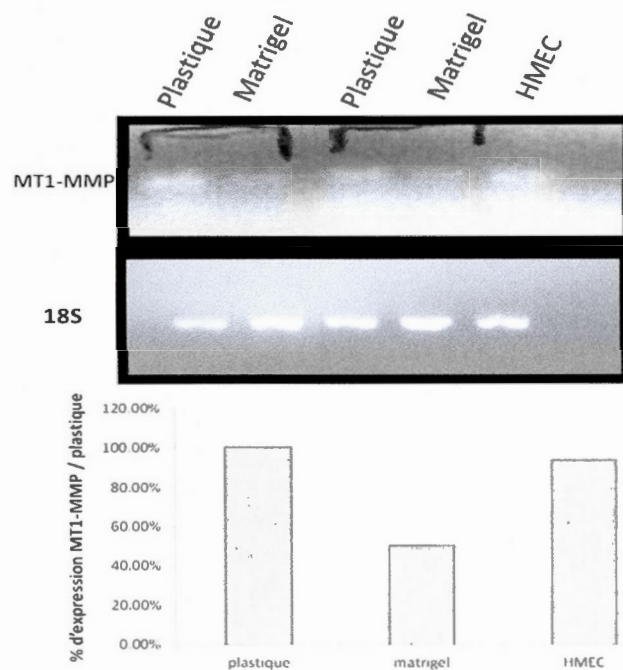


Figure 4.8 : *Expression du MT1-MMP chez les CSMh*: Partie supérieure: Gel d'électrophorèse du produit de RT-PCR de MT1-MMP des CSMh sur Matrigel ou sur plastique. L'ARN de cellules endothéliales HMEC est utilisé comme contrôle positif. Milieu : L'expérience est normalisée avec une RT-PCR 18s. En bas : Histogramme du % d'expression MT1-MMP/plastique normalisé sur le plastique à 100%.

Lors de la formation de structure sur Matrigel les CSMh ont une diminution d'expression de MT1-MMP. Le niveau d'expression sur plastique est équivalent à celui des cellules endothéliales HMEC. La MT1-MMP est moins exprimée lorsque les cellules sont sur Matrigel. Cette baisse d'expression de MT1-MMP corrèle avec une augmentation de l'expression du CD44.

CHAPITRE V

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les cellules stromales de la moelle osseuse humaines montrent des capacités pro-angiogéniques *in vivo* et *in vitro*. Différents aspects de leur comportement cellulaire permettent d'expliquer en partie ces propriétés. En premier lieu, les CSMh répondent activement aux signaux de β FGF sécrété généralement dans les cas de stress tissulaire. Il est normalement ancré à la membrane des cellules de soutien vasculaire, mais est par des enzymes dégradant l'héparan sulfate et joue alors un rôle de médiateur dans l'angiogenèse. C'est un signal migratoire fort qui peut entraîner le déplacement des CSMh vers un site tissulaire endommagé. Ceci constitue un élément de réponse pour expliquer le « *homing* » des CSMh dans des zones tissulaires stressées.

En revanche, la réaction des CSMh au S1P est surprenante. Il a été décrit dans plusieurs articles que les CSM murines avaient une affinité prononcée pour le S1P lors de tests de migration.(Annabi *et al*, 2003b; Takuwa *et al*, 2010), mais il a de plus été montré que la présence de S1P en conjonction avec la MT1-MMP permet l'angiogenèse (Langlois *et al*, 2004). Cependant, il faut noter que la fonction physiologique du S1P est modulée par sa concentration dans les tissus ou le plasma. Le gradient de concentration entraine des phénomènes migratoires différents. À faible concentration, comme dans les articles d'angiogenèse mentionnés ci-dessus, le S1P est un chemoattractant puissant pour les CSMh. À plus forte concentration de S1P qui sont obtenues en cas d'inflammation normale (Chi, 2011) les CSMh ne migrent pas. L'inflammation est un phénomène naturel qui permet de recruter les différents acteurs de la réponse immunitaire. La présence sur place de cellules naturellement immunosuppressives n'est pas souhaitable. Enfin, il a été montré dans un exemple de cancer ovarien que des concentrations encore plus fortes de S1P attiraient les cellules fibroblastiques cancéreuses tout en inhibant la migration des cellules fibroblastiques normales qui sont présentes dans l'ovaire (Wang *et al*, 2008). Ces articles montrent donc un effet modulateur de la concentration de S1P sur ses capacités chemoattractives.

En second lieu, les CSMh offrent un profil unique quant à leur affinité avec la fibronectine. Cette composante de la MEC est surtout présente lors de phénomène de réparation tissulaire ou de cicatrisation (Halper & Kjaer, 2014). La présence de fibronectine favorise alors l'ancrage des CSMh sur un site endommagé. Ces deux faits indiquent que les CSMh ont une affinité de migration et de « homing » dans un contexte nécessitant une réponse pro-angiogénique et c'est ce que nous avons pu confirmer dans le reste de l'étude.

Lorsque les CSMh sont injectées dans une matrice de Matrigel chez des souris NOD-SCID elles favorisent une néo-vascularisation des implants de Matrigel avec une efficacité proportionnelle au nombre de cellules. Cette néo-vascularisation est principalement due au relargage dans le milieu matriciel de facteurs chémoattractants permettant la migration des cellules endothéliales de l'hôte murin et une angiogenèse facilitée par les CSMh. Les CSMh restent dans l'implant et se différencient en une population exprimant fortement le hCD44 et une autre ayant une expression plus faible, probablement en péricytes. Toutefois, contrairement à ce qui a été montré dans des modèles de CSM murines, les CSMh ne se différencient pas en cellules endothéliales et ne provoquent pas non plus de fusion avec les autres cellules pour former des cellules hybrides. Cette observation confirme que les CSMh et les CSMm ne possèdent pas exactement les mêmes propriétés. Il convient donc d'être très prudent en extrapolant des résultats obtenus chez les animaux avec ce qui se passe chez l'humain. Nous ne pouvons toutefois pas totalement exclure la possibilité que : (i) les CSMh nécessitent des facteurs humains spécifiques pour se différencier en cellules endothéliales, ces facteurs étant absents chez la souris NOD-SCID cela ne peut être montré dans ce modèle murin. (ii) les CSMh se sont différenciées en d'autres types cellulaires exprimant des marqueurs non présents dans notre panel d'anticorps.

Un autre exemple de cette différence humain/souris est illustré par la réaction des CSMh en présence d'Ilomastat. En effet, l'Ilomastat qui est un inhibiteur des MMP à large spectre n'influence pas du tout le phénomène de formation de structure sur Matrigel. Comme attendu l'Ilomastat a un effet sur le niveau d'expression du CD44, mais cet effet est marginal et n'impacte pas le remodelage de la MEC du Matrigel. La formation de tubulures par les

CSMh est indépendante de l'action des MMP. Il se produit selon un ou des mécanismes encore à être élucidés.

L'ensemble des observations montre que les CSMh peuvent être impliquées dans le processus de guérison tissulaire de quatre façons complémentaires : (i) en migrant aux sites de dommage tissulaire suite à l'activation du bFGF, (ii) en adhérant de manière privilégiée avec la matrice extracellulaire riche en fibronectine du site ayant subi un stress, (iii) en lançant un S.O.S en réponse au stress hypoxique en initiant la cascade pro-angiogénique et en favorisant le recrutement des cellules endothéliales sur site, et (iv) en se différenciant en péricytes pour supporter la structure des nouveaux vaisseaux formés en fin de cascade pro-angiogénique. Dans le cadre de cette étude, nous avons pu confirmer les propriétés pro-angiogéniques des CSMh. Cette propriété, à elle seule, justifie déjà l'utilisation de ces cellules dans différents modèles thérapeutiques. Il n'est pas interdit d'imaginer élargir leur usage dans de nombreuses thérapies. Elles sont déjà très largement testées dans de nombreux modèles humains avec succès.

Dans le domaine de la réparation tissulaire, les CSMh peuvent faciliter la réparation du tissu cardiaque après un infarctus (Schuleri *et al*, 2007), ou dans le cas d'un ulcère diabétique ou de maladie chronique du foie (Levicar *et al*, 2007) ou encore dans le cas très encourageant de traitement de patients souffrant d'ostéogénésis imperfecta (Horwitz *et al*, 2001). Les propriétés immunosuppressives des CSMh, quant à elles, permettent d'envisager sérieusement un traitement de la GvHD de type 4 autrement mortelle (Le Blanc *et al*, 2008), mais peut aussi permettre d'envisager son utilisation en traitement préventif. Les CSMh sont facilement modifiables génétiquement et elles peuvent servir de véhicule pour transporter des médicaments en plein cœur de cancers pour lesquels elles ont démontré une très grande affinité (Asahara, 2007), ou encore avec le même objectif anticancéreux en tête pourquoi ne pas utiliser leur capacité de présentation d'antigène pour vacciner contre le cancer ? D'autres potentiels thérapeutiques sont de plus en plus étudiés comme notamment pour la réparation du tissu osseux (Romagnoli & Brandi, 2014), de la moelle épinière (Dasari *et al*, 2014), du tissu neural ou de la rétine (Ng *et al*, 2014), et enfin même dans le traitement des patients ayant subi des radiations (Akita, 2014).

Les applications potentielles sont nombreuses. L'un des avantages essentiels de ces cellules est qu'elles sont facilement isolables à partir de la moelle osseuse, mais à partir de nombreuses autres sources tissulaires (tissu adipeux, circulation générale, tissu placentaire). Il est passionnant d'envisager l'avenir médical des CSMh, pourquoi pas par la constitution de banques de cellules autologues qui constitueraient en quelque sorte notre assurance réparation ? Juste une petite injection dans le myocarde pour se remettre d'un infarctus ou bien une petite colle à base d'extrait de CSMh pour mieux cicatriser. Et pourquoi pas un vaporisateur immunosuppresseur dans le traitement de l'allergie? La médecine devient de plus en plus personnalisée. Il reste malheureusement de nombreuses maladies encore incurables et nous pouvons espérer que des approches originales utilisant les hCSM permettront d'améliorer encore les chances de guérison dans ces cas encore désespérés.

CONCLUSION

Au début de ce projet, les CSMh n'étaient pas encore utilisées dans notre laboratoire. Toute notre expertise et nos observations avaient été développées sur des modèles murins de thérapie cellulaire ou de thérapie génique utilisant les CSMm. Mon objectif était non seulement de travailler avec les CSMh, mais de confirmer ou infirmer les observations obtenues chez la souris tout en utilisant au maximum mon outil de prédilection : la cytométrie de flux. Nous avons pu constater que les CSMh présentent des caractéristiques très similaires aux CSM d'autres espèces, mais il persiste quelques différences. Nous avons pu confirmer leur potentiel pro-angiogénique aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* tout en ayant des éléments de réponse quant à leur mécanisme d'action. Les CSMh demeurent un vaste champ d'études qui s'est élargi depuis quelques années à une vaste communauté scientifique. Leur bénéfice thérapeutique potentiel, mais aussi déjà avéré, n'est pas étranger à cet intérêt toujours grandissant. Entre le début de cette étude et ce mémoire, de nombreuses questions qui n'étaient que des hypothèses de ma part ont vu leur confirmation au fil des années dans la littérature.

BIBLIOGRAPHIE

- Adams, R.H. & Alitalo, K. (2007) Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **8**, 464–478
- Aghi, M. & Chiocca, E.A. (2005) Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and Tumors. *Molecular therapy*, **12**, 994–1005
- Aiuti, A., Biasco, L., Scaramuzza, S., Ferrua, F., Cicalese, M.P., Baricordi, C., Dionisio, F., Calabria, A., Giannelli, S., Castiello, M.C., Bosticardo, M., Evangelio, C., Assanelli, A., Casiraghi, M., Di Nunzio, S., Callegaro, L., Benati, C., Rizzardi, P., Pellin, D., Di Serio, C., et al (2013) Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science*, **341**, 853-855
- Akita, S. (2014) Treatment of radiation injury. *Advances in wound care*, **3**, 1–11
- Alitalo, K., Tammela, T. & Petrova, T. (2005) Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature*, **438**, 946–953
- Al-Khaldi, A., Al-Sabti, H., Galipeau, J. & Lachapelle, K. (2003a) Therapeutic angiogenesis using autologous bone marrow stromal cells: improved blood flow in a chronic limb ischemia model. *The annals of thoracic surgery*, **75**, 204–209
- Al-Khaldi, A., Eliopoulos, N., Martineau, D., Lejeune, L., Lachapelle, K. & Galipeau, J. (2003b) Postnatal bone marrow stromal cells elicit a potent VEGF-dependent neoangiogenic response in vivo. *Gene therapy*, **10**, 621–629
- Annabi, B., Bouzeghrane, M., Moumdjian, R., Moghrabi, A. & Béliveau, R. (2005) Probing the infiltrating character of brain tumors: inhibition of RhoA/ROK-mediated CD44 cell surface shedding from glioma cells by the green tea catechin EGCG. *Journal of neurochemistry*, **94**, 906–916

- Annabi, B., Lachambre, M., Bousquet-Gagnon, N., Pagé, M., Gingras, D. & Béliveau, R. (2001) Localization of membrane-type 1 matrix metalloproteinase in caveolae membrane domains. *The biochemical journal*, **353**, 547–553
- Annabi, B., Lee, Y.-T., Turcotte, S., Naud, E., Desrosiers, R.R., Champagne, M., Eliopoulos, N., Galipeau, J., Béliveau, R. (2003a) Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem cells*, **21**, 337–347
- Annabi, B., Naud, E., Lee, Y.-T., Eliopoulos, N. & Galipeau, J. (2004) Vascular progenitors derived from murine bone marrow stromal cells are regulated by fibroblast growth factor and are avidly recruited by vascularizing tumors. *Journal of cellular biochemistry*, **91**, 1146–1158
- Annabi, B., Thibeault, S., Lee, Y.T., Bousquet-Gagnon, N., Eliopoulos, N., Barrette, S., Galipeau, J. & Beliveau, R. (2003b) Matrix metalloproteinase regulation of sphingosine-1-phosphate-induced angiogenic properties of bone marrow stromal cells. *Experimental hematology*, **31**, 640–649
- Asahara, T. (2007) Cell therapy and gene therapy using endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Handbook of experimental pharmacology*, **180**, 181–194
- Barda-Saad, M., Rozenszajn, L.A., Globerson, A., Zhang, A.S. & Zipori, D. (1996) Selective adhesion of immature thymocytes to bone marrow stromal cells: relevance to T cell lymphopoiesis. *Experimental hematology*, **24**, 386–391
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., Remberger, M., Dini, G., Egeler, R.M., Bacigalupo, A., Fibbe, W. & Ringdén, O. (2008) Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, **371**, 1579–1586

- Buckner, C.D., Epstein, R.B., Rudolph, R.H., Clift, R.A., Thomas, E.D. & Storb, R. (1970) Allogeneic marrow engraftment following whole body irradiation in a patient with leukemia. *Blood*, **35**, 741–750
- Campeau, P.M., Rafei, M., Boivin, M.-N., Sun, Y., Grabowski, G. & Galipeau, J. (2009) Characterization of Gaucher disease bone marrow mesenchymal stromal cells reveals an altered inflammatory secretome. *Blood*, **114**, 3181–3190
- Caplan, A.I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research*, **9**, 641–650
- Caplan, A.I. & Dennis, J.E. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *Journal of cellular biochemistry*, **98**, 1076–1084
- Cavazzana-Calvo, M., Hacein-Bey, S., de Saint Basile, G., Gross, F., Yvon, E., Nusbaum, P., Selz, F., Hue, C., Certain, S., Casanova, J.L., Bousso, P., Deist, F.L. & Fischer, A. (2000) Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science*, **288**, 669–672
- Chen, L., Tredget, E.E., Liu, C. & Wu, Y. (2009) Analysis of allogenicity of mesenchymal stem cells in engraftment and wound healing in mice. *PloS one*, **4**, e7119
- Cheng, C., Chrifi, I., Pasterkamp, G. & Duckers, H.J. (2013) Biological mechanisms of microvessel formation in advanced atherosclerosis: the big five. *Trends in cardiovascular medicine*, **23**, 153–164
- Chi, H. (2011) Sphingosine-1-phosphate and immune regulation: trafficking and beyond. *Trends in pharmacological sciences*, **32**, 16–24
- Chung, A.S., Lee, J. & Ferrara, N. (2010) Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis. *Nature reviews. Cancer*, **10**, 505–514

- Cichy, J. & Puré, E. (2003) The liberation of CD44. *The journal of cell biology*, **161**, 839–843
- Clark, B.R. & Keating, A. (1995) Biology of bone marrow stroma. *Annals of the New York academy of sciences*, **770**, 70–78
- Coulombe, L., Eaves, A.C. & Eaves, C.J. (1983) Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood*, **62**, 291–297
- Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.-W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.-N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Buhring, H.-J., Giacobino, J.-P., Lazzari, L., Huard, J., et al (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell*, **3**, 301–313
- Danielyan, L., Schäfer, R., von Ameln-Mayerhofer, A., Bernhard, F., Verleysdonk, S., Buadze, M., Lourhmati, A., Klopfer, T., Schaumann, F., Schmid, B., Koehle, C., Proksch, B., Weissert, R., Reichardt, H.M., van den Brandt, J., Buniatian, G.H., Schwab, M., Gleiter, C.H. & Frey, W.H. (2011) Therapeutic efficacy of intranasally delivered mesenchymal stem cells in a rat model of Parkinson disease. *Rejuvenation research*, **14**, 3–16
- Dasari, V.R., Veeravalli, K.K. & Dinh, D.H. (2014) Mesenchymal stem cells in the treatment of spinal cord injuries: A review. *World journal of stem cells*, **6**, 120–133
- Deans, R.J. & Moseley, A.B. (2000) Mesenchymal stem cells : Biology and potential clinical uses. *Experimental hematology*, **28**, 875–884
- Delalat, B., Pourfathollah, A.A., Soleimani, M., Mozdarani, H., Ghaemi, S.R., Movassaghpour, A.A. & Kaviani, S. (2009) Isolation and ex vivo expansion of human

umbilical cord blood-derived CD34⁺ stem cells and their cotransplantation with or without mesenchymal stem cells. *Hematology*, **14**, 125–132

Deng, X., Szabo, S., Chen, L., Paunovic, B., Khomenko, T., Tolstanova, G., Tarnawski, A.S., Jones, M.K. & Sandor, Z. (2011) New cell therapy using bone marrow-derived stem cells/endothelial progenitor cells to accelerate neovascularization in healing of experimental ulcerative colitis. *Current pharmaceutical design*, **17**, 1643–1651

Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D. & Jorgensen, C. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, **102**, 3837–3844

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, a, Prockop, D., Horwitz, E., Therapy, A.C. & Transplant, M. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, **8**, 315–317

Dunsmore, S.E. & Shapiro, S.D. (2004) The bone marrow leaves its scar: new concepts in pulmonary fibrosis. *The journal of clinical investigation*, **113**, 180–182

Edwards, A.K., Nakamura, D.S., Virani, S., Wessels, J.M. & Tayade, C. (2013) Animal models for anti-angiogenic therapy in endometriosis. *Journal of reproductive immunology*, **97**, 85–94

Eliopoulos, N., Al-Khaldi, a, Crosato, M., Lachapelle, K. & Galipeau, J. (2003) A neovascularized organoid derived from retrovirally engineered bone marrow stroma leads to prolonged in vivo systemic delivery of erythropoietin in nonmyeloablated, immunocompetent mice. *Gene therapy*, **10**, 478–489

- Eliopoulos, N., Lejeune, L., Martineau, D. & Galipeau, J. (2004) Human-compatible collagen matrix for prolonged and reversible systemic delivery of erythropoietin in mice from gene-modified marrow stromal cells. *Molecular*, **10**, 741–748
- Eliopoulos, N., Stagg, J., Lejeune, L., Pommey, S. & Galipeau, J. (2005) Allogeneic marrow stromal cells are immune rejected by MHC class I- and class II-mismatched recipient mice. *Blood*, **106**, 4057–4065
- Ferrari, G., Cusella-De Angelis, G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A., Cossu, G. & Mavilio, F. (1998) Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*, **279**, 1528–1530
- Ferrebee, J.W. & Thomas, E.D. (1958) Radiation injury and marrow replacement: factors affecting survival of the host and the homograft. *Annals of internal medicine*, **49**, 987–1003
- Fingleton, B. (2007) Matrix metalloproteinases as valid clinical targets. *Current pharmaceutical design*, **13**, 333–346
- Fiorina, P., Jurewicz, M., Augello, A., Vergani, A., Dada, S., La Rosa, S., Selig, M., Godwin, J., Law, K., Placidi, C., Smith, R.N., Capella, C., Rodig, S., Adra, C.N., Atkinson, M., Sayegh, M.H. & Abdi, R. (2009) Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *Journal of immunology*, **183**, 993–1004
- Folkman, J. (2007) Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nature reviews. Drug discovery*, **6**, 273–286
- Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C. & Williams, G. (1971) Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *The Journal of experimental medicine*, **133**, 275–288

- Friedenstein, A.J. (1961) Osteogenetic activity of transplanted transitional epithelium. *Acta anatomica*, **45**, 31–59
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K. & Lalykina, K.S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell and tissue kinetics*, **3**, 393–403
- Gingras, D., Bousquet-Gagnon, N., Langlois, S., Lachambre, M.P., Annabi, B. & Béliveau, R. (2001) Activation of the extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) cascade by membrane-type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS letters*, **507**, 231–236
- Gnecchi, M., Zhang, Z., Ni, A. & Dzau, V.J. (2008) Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circulation research*, **103**, 1204–1219
- González, M.A., Gonzalez-Rey, E., Rico, L., Büscher, D. & Delgado, M. (2009) Treatment of experimental arthritis by inducing immune tolerance with human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Arthritis and rheumatism*, **60**, 1006–1019
- Goodwin, M., Sueblinvong, V., Eisenhauer, P., Ziats, N.P., LeClair, L., Poynter, M.E., Steele, C., Rincon, M. & Weiss, D.J. (2011) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells inhibit Th2-mediated allergic airways inflammation in mice. *Stem cells*, **29**, 1137–1148
- Granero-Moltó, F., Weis, J.A., Miga, M.I., Landis, B., Myers, T.J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E.D., Mortlock, D.P. & Spagnoli, A. (2009) Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells*, **27**, 1887–1898
- Gratwohl, A., Baldomero, H. & Passweg, J. (2013) Hematopoietic stem cell transplantation activity in Europe. *Current opinion in hematology*, **20**, 485–493

- Halper, J. & Kjaer, M. (2014) Basic components of connective tissues and extracellular matrix: elastin, fibrillin, fibulins, fibrinogen, fibronectin, laminin, tenascins and thrombospondins. *Advances in experimental medicine and biology*, **802**, 31–47
- Hare, J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., Hermiller, J.B., Reisman, M.A., Schaer, G.L. & Sherman, W. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the american college of cardiology*, **54**, 2277–2286
- Hatzistergos, K.E., Quevedo, H., Oskouei, B.N., Hu, Q., Feigenbaum, G.S., Margitich, I.S., Mazhari, R., Boyle, A.J., Zambrano, J.P., Rodriguez, J.E., Dulce, R., Pattany, P.M., Valdes, D., Revilla, C., Heldman, A.W., McNiece, I. & Hare, J.M. (2010) Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circulation research*, **107**, 913–922
- Horwitz, E.M., Gordon, P.L., Koo, W.K.K., Marx, J.C., Neel, M.D., McNall, R.Y., Muul, L. & Hofmann, T. (2002) Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **99**, 8932–8937
- Horwitz, E.M., Prockop, D.J., Gordon, P.L., Koo, W.W.K., Fitzpatrick, L.A., Neel, M.D., Mccarville, M.E., Orchard, P.J., Pyeritz, R.E. & Brenner, M.K. (2001) Clinical responses to bone marrow transplantation in children with severe osteogenesis imperfecta. *Blood*, **97**, 1227–1231
- Hotary, K., Allen, E., Punturieri, A., Yana, I. & Weiss, S.J. (2000) Regulation of cell invasion and morphogenesis in a three-dimensional type I collagen matrix by

- membrane-type matrix metalloproteinases 1, 2, and 3. *The Journal of cell biology*, **149**, 1309–23
- House, S.L., Bolte, C., Zhou, M., Doetschman, T., Klevitsky, R., Newman, G. & Schultz, J.E.J. (2003) Cardiac-specific overexpression of fibroblast growth factor-2 protects against myocardial dysfunction and infarction in a murine model of low-flow ischemia. *Circulation*, **108**, 3140–8
- Howangyin, K.Y. & Silvestre, J.-S. (2014) Diabetes Mellitus and Ischemic Diseases: Molecular Mechanisms of Vascular Repair Dysfunction. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, **34**, 1126–1135
- Hughes, C.S., Postovit, L.M. & Lajoie, G. (2010) Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics*, **10**, 1886–1890
- Kan, I., Melamed, E., Offen, D. & Melamed, I.K.E. (2007) Autotransplantation of bone marrow-derived stem cells as a therapy for neurodegenerative diseases. *Handbook of experimental pharmacology*, 219–242
- Kebriaei, P., Isola, L., Bahceci, E., Holland, K., Rowley, S., McGuirk, J., Devetten, M., Jansen, J., Herzig, R., Schuster, M., Monroy, R. & Uberti, J. (2009) Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biology of blood and marrow transplantation*, **15**, 804–811
- Khakoo, A.Y., Pati, S., Anderson, S.A., Reid, W., Elshal, M.F., Rovira, I.I., Nguyen, A.T., Malide, D., Combs, C.A., Hall, G., Zhang, J., Raffeld, M., Rogers, T.B., Stetler-Stevenson, W., Frank, J. a, Reitz, M. & Finkel, T. (2006) Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The journal of experimental medicine*, **203**, 1235–1247

- Kharaziha, P., Hellström, P.M., Noorinayer, B., Farzaneh, F., Aghajani, K., Jafari, F., Telkabadi, M., Atashi, A., Honardoost, M., Zali, M.R. & Soleimani, M. (2009) Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *European journal of gastroenterology & hepatology*, **21**, 1199–1205
- Khubutiya, M.S., Vagabov, A. V, Temnov, A. a & Sklifas, A.N. (2014) Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. *Cytotherapy*, **16**, 579–585
- Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M.S., Shou, M., Lee, C.W., Barr, S., Fuchs, S. & Epstein, S.E. (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation*, **109**, 1543–1549
- Kishk, N.A., Gabr, H., Hamdy, S., Afifi, L., Abokresha, N., Mahmoud, H., Wafaie, A. & Bilal, D. (2010) Case control series of intrathecal autologous bone marrow mesenchymal stem cell therapy for chronic spinal cord injury. *Neurorehabilitation and neural repair*, **24**, 702–708
- Klein, D., Weisshardt, P., Kleff, V., Jastrow, H., Jakob, H.G. & Ergün, S. (2011) Vascular wall-resident CD44+ multipotent stem cells give rise to pericytes and smooth muscle cells and contribute to new vessel maturation. *PloS one*, **6**, e20540
- Kostourou, V. & Papalazarou, V. (2014) Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochimica et biophysica acta*, **1840**, 2403–2413
- Lafleur, M.A., Handsley, M.M., Knäuper, V., Murphy, G. & Edwards, D.R. (2002) Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *Journal of cell science*, **115**, 3427–3438

- Langlois, S., Gingras, D. & Béliveau, R. (2004) Membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) cooperates with sphingosine 1-phosphate to induce endothelial cell migration and morphogenic differentiation. *Blood*, **103**, 3020–3028
- Langlois, S., Nyalendo, C., Di Tomasso, G., Labrecque, L., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. & Béliveau, R. (2007) Membrane-type 1 matrix metalloproteinase stimulates cell migration through epidermal growth factor receptor transactivation. *Molecular cancer research*, **5**, 569–583
- Langlois, S., Di Tomasso, G., Boivin, D., Roghi, C., Murphy, G., Gingras, D. & Béliveau, R. (2005) Membrane type 1-matrix metalloproteinase induces endothelial cell morphogenic differentiation by a caspase-dependent mechanism. *Experimental cell research*, **307**, 452–464
- Lazarus, H.M., Koc, O.N., Devine, S.M., Curtin, P., Maziarz, R.T., Holland, H.K., Shpall, E.J., McCarthy, P., Atkinson, K., Cooper, B.W., Gerson, S.L., Laughlin, M.J., Loberiza, F.R., Moseley, A.B. & Bacigalupo, A. (2005) Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biology of blood and marrow transplantation*, **11**, 389–98
- Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., Ringdén, O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*, **363**, 1439–1441
- Le Blanc, K., Le, Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. & Ringde, O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* **31**, 890–896.
- Lecourt, S., Mouly, E., Freida, D., Cras, A., Ceccaldi, R., Heraoui, D., Chomienne, C., Marolleau, J.-P., Arnulf, B., Porcher, R., Caillaud, C., Vanneaux, V., Belmatoug, N. &

- Larghero, J. (2013) A prospective study of bone marrow hematopoietic and mesenchymal stem cells in type 1 Gaucher disease patients. *PloS one*, **8**, e69293
- Lee, P.H., Kim, J.W., Bang, O.Y., Ahn, Y.H., Joo, I.S. & Huh, K. (2008) Autologous mesenchymal stem cell therapy delays the progression of neurological deficits in patients with multiple system atrophy. *Clinical pharmacology and therapeutics*, **83**, 723–730
- Levicar, N., Dimarakis, I., Flores, C., Tracey, J., Gordon, M.Y., Habib, N.A. & Levi, N. (2007) Stem cells as a treatment for chronic liver disease and diabetes. *Handbook of experimental pharmacology*, 243–262
- Liu, Y., Dulchavsky, D.S., Gao, X., Kwon, D., Chopp, M., Dulchavsky, S. & Gautam, S.C. (2006) Wound repair by bone marrow stromal cells through growth factor production. *The journal of surgical research*, **136**, 336–341
- Lord, B.I. & Wright, E.G. (1980) Sources of haemopoietic stem cell proliferation: stimulators and inhibitors. *Blood cells*, **6**, 581–593
- Lu, C., Li, X.-Y., Hu, Y., Rowe, R.G. & Weiss, S.J. (2010) MT1-MMP controls human mesenchymal stem cell trafficking and differentiation. *Blood*, **115**, 221–229
- Lu, D., Chen, B., Liang, Z., Deng, W., Jiang, Y., Li, S., Xu, J., Wu, Q., Zhang, Z., Xie, B. & Chen, S. (2011) Comparison of bone marrow mesenchymal stem cells with bone marrow-derived mononuclear cells for treatment of diabetic critical limb ischemia and foot ulcer: a double-blind, randomized, controlled trial. *Diabetes research and clinical practice*, **92**, 26–36
- Mazo, I.B., Honczarenko, M., Leung, H., Cavanagh, L.L., Bonasio, R., Weninger, W., Engelke, K., Xia, L., McEver, R.P., Koni, P.A., Silberstein, L.E. & von Andrian, U.H.

- (2005) Bone marrow is a major reservoir and site of recruitment for central memory CD8⁺ T cells. *Immunity*, **22**, 259–270
- Meirelles, L. & Nardi, N.B. (2009) Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. *Frontiers in bioscience*, **14**, 4281–4298
- Meirelles, L.D.S., Fontes, A.M., Covas, D.T. & Caplan, A.I. (2009) Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine & growth factor reviews*, **20**, 419–427
- Milne, C.D., Fleming, H.E., Zhang, Y. & Paige, C.J. (2004) Mechanisms of selection mediated by interleukin-7, the preBCR, and hemokinin-1 during B-cell development. *Immunological reviews*, **197**, 75–88
- Mishra, P.J., Mishra, P.J., Humeniuk, R., Medina, D.J., Alexe, G., Mesirov, J.P., Ganesan, S., Glod, J.W. & Banerjee, D. (2008) Carcinoma-associated fibroblast-like differentiation of human mesenchymal stem cells. *Cancer research*, **68**, 4331–4339
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S. & Mori, H. (2006) Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nature medicine*, **12**, 459–465
- Mori, H., Tomari, T., Koshikawa, N., Kajita, M., Itoh, Y., Sato, H., Tojo, H., Yana, I. & Seiki, M. (2002) CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain. *The EMBO journal*, **21**, 3949–3959
- Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., Andreeff, M. & Lang, F.F. (2005) Human bone marrow-

derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer research*, **65**, 3307–3318

Negi, L.M., Talegaonkar, S., Jaggi, M., Ahmad, F.J., Iqbal, Z. & Khar, R.K. (2012) Role of CD44 in tumour progression and strategies for targeting. *Journal of drug targeting*, **20**, 561–573

Neirinckx, V., Coste, C., Rogister, B. & Wislet-Gendebien, S. (2013) Concise review: adult mesenchymal stem cells, adult neural crest stem cells, and therapy of neurological pathologies: a state of play. *Stem cells translational medicine*, **2**, 284–296

Ng, T.K., Fortino, V.R., Pelaez, D. & Cheung, H.S. (2014) Progress of mesenchymal stem cell therapy for neural and retinal diseases. *World journal of stem cells*, **6**, 111–119

Nikitovic, D., Kouvidi, K., Karamanos, N.K. & Tzanakakis, G.N. (2013) The roles of hyaluronan/RHAMM/CD44 and their respective interactions along the insidious pathways of fibrosarcoma progression. *BioMed research international*, **2013**, 929531

Noonan, J.E., Jenkins, A.J., Ma, J.-X., Keech, A.C., Wang, J.J. & Lamoureux, E.L. (2013) An update on the molecular actions of fenofibrate and its clinical effects on diabetic retinopathy and other microvascular end points in patients with diabetes. *Diabetes*, **62**, 3968–3975

Orian-Rousseau, V. (2010) CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *European journal of cancer*, **46**, 1271–1277

Orlic, D., Kajstura, J., Chimenti, S., Jakoniuk, I., Anderson, S.M., Li, B., Pickel, J., McKay, R., Nadal-Ginard, B., Bodine, D.M., Leri, A. & Anversa, P. (2001) Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*, **410**, 701–705

- Ortiz, L.A., Dutreil, M., Fattman, C., Pandey, A.C., Torres, G., Go, K. & Phinney, D.G. (2007) Interleukin 1 receptor antagonist mediates the antiinflammatory and antifibrotic effect of mesenchymal stem cells during lung injury. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **104**, 11002–11007
- Papetti, M. & Herman, I.M. (2002) Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *American journal of physiology. Cell physiology*, **282**, C947–970
- Peng, L., Xie, D., Lin, B., Liu, J. & Zhu, H. (2011) Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: Short-term and long-term outcomes. *Hepatology*, **54**, 1891–1892
- Pittenger, M.F. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, **284**, 143–147
- Pommey, S., Galipeau, J., Mortimer, S. & Montréal, B.D. De (2006) The use of mesenchymal stromal cells in oncology and cell therapy. *Bulletin du cancer*, **93**, 901–907
- Ponta, H., Sherman, L. & Herrlich, P. (2003) CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **4**, 33–45
- Pousa, I.D., Maté, J. & Gisbert, J.P. (2008) Angiogenesis in inflammatory bowel disease. *European journal of clinical investigation*, **38**, 73–81
- Prasad, V.K., Lucas, K.G., Kleiner, G.I., Talano, J.A.M., Jacobsohn, D., Broadwater, G., Monroy, R. & Kurtzberg, J. (2011) Efficacy and safety of ex vivo cultured adult human mesenchymal stem cells (ProchymalTM) in pediatric patients with severe refractory acute graft-versus-host disease in a compassionate use study. *Biology of blood and marrow transplantation*, **17**, 534–41

- Prockop, D.J. (2003) Further proof of the plasticity of adult stem cells and their role in tissue repair. *The journal of cell biology*, **160**, 807–809
- Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C. & Shi, Y. (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*, **2**, 141–150
- Ribatti, D., Nico, B. & Crivellato, E. (2011) The role of pericytes in angiogenesis. *The international journal of developmental biology*, **55**, 261–268
- Ries, C., Egea, V., Karow, M., Kolb, H., Jochum, M. & Neth, P. (2007) MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines. *Blood*, **109**, 4055–4063
- Roddy, G.W., Oh, J.Y., Lee, R.H., Bartosh, T.J., Ylostalo, J., Coble, K., Rosa, R.H. & Prockop, D.J. (2011) Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF- α stimulated gene/protein 6. *Stem cells*, **29**, 1572–9
- Romagnoli, C. & Brandi, M.L. (2014) Adipose mesenchymal stem cells in the field of bone tissue engineering. *World journal of stem cells*, **6**, 144–152
- Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M.-N., Stagg, J. & Galipeau, J. (2007) Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN- γ , TGF- β , and cell density. *Journal of immunology*, **179**, 1549–1558
- Røsland, G.V., Svendsen, A., Torsvik, A., Sobala, E., McCormack, E., Immervoll, H., Mysliwicz, J., Tonn, J.-C., Goldbrunner, R., Lønning, P.E., Bjerkvig, R. & Schichor, C. (2009) Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells

- frequently undergo spontaneous malignant transformation. *Cancer research*, **69**, 5331–5339
- Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martín, M.C., de la Fuente, R., Cigudosa, J.C., Lloyd, A.C. & Bernad, A. (2005) Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer research*, **65**, 3035–3039
- Sakaida, I., Terai, S., Yamamoto, N., Aoyama, K., Ishikawa, T., Nishina, H. & Okita, K. (2004) Transplantation of bone marrow cells reduces CCl₄-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, **40**, 1304–1311
- Sánchez, L., Gutierrez-Aranda, I., Ligero, G., Rubio, R., Muñoz-López, M., García-Pérez, J.L., Ramos, V., Real, P.J., Bueno, C., Rodríguez, R., Delgado, M. & Menendez, P. (2011) Enrichment of human ESC-derived multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive and anti-inflammatory properties capable to protect against experimental inflammatory bowel disease. *Stem cells*, **29**, 251–262
- Schuleri, K.H., Boyle, a J. & Hare, J.M. (2007) Mesenchymal stem cells for cardiac regenerative therapy. *Handbook of experimental pharmacology*, 195–218
- Shimonaka, M., Katagiri, K., Nakayama, T., Fujita, N., Tsuruo, T., Yoshie, O. & Kinashi, T. (2003) Rap1 translates chemokine signals to integrin activation, cell polarization, and motility across vascular endothelium under flow. *The Journal of cell biology*, **161**, 417–427
- Silver, F.H. & Trelstad, R.L. (1980) Type I collagen in solution. Structure and properties of fibril fragments. *The journal of biological chemistry*, **255**, 9427–9433
- Slevin, M., Krupinski, J., Gaffney, J., Matou, S., West, D., Delisser, H., Savani, R.C. & Kumar, S. (2007) Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease : Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways. *Matrix biology*, **26**, 58–68

- Spaeth, E.L., Labaff, A.M., Toole, B.P., Klopp, A., Andreeff, M. & Marini, F.C. (2013) Mesenchymal CD44 expression contributes to the acquisition of an activated fibroblast phenotype via TWIST activation in the tumor microenvironment. *Cancer research*, **73**, 5347–5359
- Spees, J.L., Olson, S.D., Ylostalo, J., Lynch, P.J., Smith, J., Perry, A., Peister, A., Wang, M.Y. & Prockop, D.J. (2003) Differentiation, cell fusion, and nuclear fusion during ex vivo repair of epithelium by human adult stem cells from bone marrow stroma. *Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America*, **100**, 2397–2402
- Stagg, J., Lejeune, L., Paquin, A. & Galipeau, J. (2004) Marrow stromal cells for interleukin-2 delivery in cancer immunotherapy. *Human gene therapy*, **15**, 597–608
- Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N. & Galipeau, J. (2006) Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood*, **107**, 2570–2577
- Steingen, C., Brenig, F., Baumgartner, L., Schmidt, J., Schmidt, A. & Bloch, W. (2008) Characterization of key mechanisms in transmigration and invasion of mesenchymal stem cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **44**, 1072–1084
- Studeny, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J. & Andreeff, M. (2002) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer research*, **62**, 3603–3608
- Sun, L., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Hou, Y., Zhao, S., Xu, T., Le, A. & Shi, S. (2009) Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem cells*, **27**, 1421–1432

- Takuwa, Y., Du, W., Qi, X., Okamoto, Y., Takuwa, N. & Yoshioka, K. (2010) Roles of sphingosine-1-phosphate signaling in angiogenesis. *World journal of biological chemistry*, **1**, 298–306
- Theise, N.D., Nimmakayalu, M., Gardner, R., Illei, P.B., Morgan, G., Teperman, L., Henegariu, O. & Krause, D.S. (2000) Liver from bone marrow in humans. *Hepatology*, **32**, 11–6
- Till, J.E. & McCulloch, E.A. (2012) A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. 1961. *Radiation research*, **178**, AV3–7
- Torlakovic, E., Tenstad, E., Funderud, S. & Rian, E. (2005) CD10+ stromal cells form B-lymphocyte maturation niches in the human bone marrow. *The journal of pathology*, **205**, 311–317
- Tyndall, A., Walker, U.A., Cope, A., Dazzi, F., Bari, C. De, Guiducci, S., Jones, S., Jorgensen, C., Blanc, K. Le, Luyten, F., McGonagle, D., Martin, I., Bocelli-tyndall, C., Pennesi, G., Pistoia, V., Pitzalis, C., Uccelli, A., Wulffraat, N. & Feldmann, M. (2005) Meeting report Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: a review based on an interdisciplinary meeting held at the Kennedy Institute of Rheumatology Division, London, UK, 31 October 2005. *Arthritis research & therapy*, **10**, 301–310
- Uccelli, A., Pistoia, V. & Moretta, L. (2007) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression? *Trends in immunology*, **28**, 219–226
- Wang, D., Zhao, Z., Caperell-Grant, A., Yang, G., Mok, S.C., Liu, J., Bigsby, R.M. & Xu, Y. (2008) S1P differentially regulates migration of human ovarian cancer and human ovarian surface epithelial cells. *Molecular cancer therapeutics*, **7**, 1993–2002

- Weidemann, A.K., Crawshaw, A.A., Byrne, E. & Young, H.S. (2013) Vascular endothelial growth factor inhibitors: investigational therapies for the treatment of psoriasis. *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*, **6**, 233–244
- West, D.C., Hampson, I.N., Arnold, F. & Kumar, S. (1985) Angiogenesis induced by degradation products of hyaluronic acid. *Science*, **228**, 1324–1326
- Worton, R.G., McCulloch, E.A. & Till, J.E. (1969) Physical separation of hemopoietic stem cells from cells forming colonies in culture. *Journal of cellular physiology*, **74**, 171–182
- Yamada, Y., Ueda, M., Hibi, H. & Baba, S. (2006) A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report. *The International journal of periodontics & restorative dentistry*, **26**, 363–369
- Yañez, R., Lamana, M.L., García-Castro, J., Colmenero, I., Ramírez, M. & Bueren, J.A. (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells*, **24**, 2582–2591
- Yatohgo, T., Izumi, M., Kashiwagi, H. & Hayashi, M. (1988) Novel purification of vitronectin from human plasma by heparin affinity chromatography. *Cell structure and function*, **13**, 281–292
- Yoon, S.-O., Park, S.-J., Yun, C.-H. & Chung, A.-S. (2003) Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *Journal of biochemistry and molecular biology*, **36**, 128–137
- Zeng, X., Zeng, Y., Ma, Y., Lu, L. & Du, B. (2011) Bone marrow mesenchymal stem cells in a three-dimensional gelatin sponge scaffold attenuate inflammation, promote angiogenesis, and reduce cavity formation in. *Cell transplantation*, **20**, 1881–1899

- Zhang, Q.-Z., Su, W.-R., Shi, S.-H., Wilder-Smith, P., Xiang, A.P., Wong, A., Nguyen, A.L., Kwon, C.W. & Le, A.D. (2010) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem cells*, **28**, 1856–68
- Zhao, X., Yue, Y., Cheng, W., Li, J., Hu, Y., qin, L. & Zhang, P. (2013) Hypoxia-inducible factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Current drug targets*, **14**, 700–707
- Zhou, H., Wang, M., Hou, C., Jin, X. & Wu, X. (2011) Exogenous VEGF-C augments the efficacy of therapeutic lymphangiogenesis induced by allogenic bone marrow stromal cells in a rabbit model of limb secondary lymphedema. *Japanese journal of clinical oncology*, **41**, 841–846